

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

580733

Клонирование ДНК

Методы

Под редакцией
Д. ГЛОВЕРА

Перевод с английского
канд. биол. наук П. Л. ИВАНОВА,
канд. биол. наук Л. Г. НИКОЛАЕВА

под редакцией
канд. биол. наук П. Л. ИВАНОВА

DNA CLONING

Volume I, II

A PRACTICAL APPROACH

Edited by D. M. Glover

Cancer Research Campaign, Eukaryotic Molecular
Genetics Research Group, Department of Biochemistry,
Imperial College of Science and Technology, London
SW7 2AZ, UK

IRL Press
Oxford Washington DC



Москва «Мир» 1988

ББК 28.04
К50
УДК 575+576

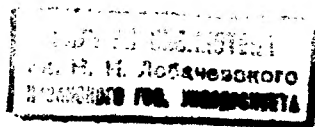
Клонирование ДНК. Методы: Пер. с англ./Под ред.
К50 Д. Гловера. — М.: Мир, 1988. — 538 с., ил.
ISBN 5-03-001159-5

Сборник новейших методов по генной инженерии, написанный выдающимися специалистами Великобритании, США, ФРГ, Италии и др. стран и удачно дополняющий современным материалом ранее изданное руководство по молекулярному клонированию (Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984).

Для молекулярных биологов, генетиков, биотехнологов.

2001040000—452
К 041(01)—88 136—88, ч. 1

ББК 28.04



Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-001159-5 (русск.)
ISBN 0-947946-18-7 (англ.)
ISBN 0-947946-19-5 (англ.)

© 1985 IRL Press
© перевод на русский язык, «Мир»,
1988

ОТ РЕДАКТОРА ПЕРЕВОДА

Предлагаемое советскому читателю руководство «Клонирование ДНК. Методы» — очень добротная, основательная книга. И хотя она имеет отношение к такой быстро развивающейся области естествознания, как молекулярная биология, материал, изложенный в ней, безусловно долго будет полезен экспериментаторам.

Двухтомник «Клонирование ДНК» (в русском издании две книги объединены) входит в серию практических руководств по молекулярной и физико-химической биологии издательства IRL Press, которое уже знакомо советской научной общественности по недавно вышедшей книге «Транскрипция и трансляция» Б. Хеймса и С. Хиггинса (М., Мир, 1987). Сборники этой серии стали достойными преемниками лабораторной «классики» — прекрасного и по идее, и по форме пособия Т. Маниатиса и др.¹⁾, в котором подробно изложены методы клонирования генов в клетках *E. coli* на уровне, достигнутом к 1981 г. Минувшие годы углубили наши знания и существенно расширили методическую базу. Это послужило мощным импульсом для развития биотехнологии, что в свою очередь заставило генных инженеров выйти за рамки экспериментов с *E. coli*. Привычными объектами генно-инженерных исследований стали бациллы и другие грамположительные бактерии, мицелиальные грибы, дрожжи, культивируемые клетки высших растений и животных, а также целые многоклеточные организмы. Каждый из этих объектов привносит свою специфику в практику лабораторных исследований и, естественно, требует от экспериментатора специальных знаний и практических навыков. Настоящая книга предоставляет прекрасную возможность приобрести такие знания и навыки или уточнить, отшлифовать уже имеющиеся. Это в полном смысле слова самоучитель молекулярного клонирования и генно-инженерного дела, правда предназначенный для достаточно квалифицированного исследователя.

Если же вернуться к классическим методам генно-инженерного манипулирования с *E. coli*, то стоит сказать следующее.

¹⁾ Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984.

Очень многие из этих методов претерпели значительные усовершенствования. Появились и принципиально новые разработки. Это позволило, в частности, некоторым биотехнологическим фирмам наладить коммерческий выпуск целого ряда высокоэффективных «полуфабрикатов» для молекулярно-биологической «кухни», которые нашли применение и в зарубежных научных центрах, и в нашей стране.

Авторы сборника — известные специалисты, многие из них являются пионерами в своей области исследования. В публикуемых разработках подробное описание лабораторных методик сочетается с развернутыми теоретическими экскурсами, с анализом возможностей того или иного метода, с изложением логики научного поиска, с моделями решений конкретных экспериментальных задач. Чисто методические разделы выполняют не только прикладные функции, но и удачно дополняют и иллюстрируют теоретический материал. Включая в себя основные, наиболее выдающиеся достижения последних лет в технологическом обеспечении молекулярно-биологических исследований, книга отражает мировой уровень работ, проводимых в данной области, и безусловно является научно-практическим руководством самого высокого класса.

П. Л. Иванов

ИЗ ПРЕДИСЛОВИЙ К I И II ТОМАМ

Настоящая книга представляет собой практическое руководство по рекомбинантной технологии и методам молекулярного клонирования ДНК. Именно эта экспериментальная техника обусловила поток информации, наблюдаемый в молекулярной биологии на протяжении последнего десятилетия. Первый том руководства посвящен клонированию в *E. coli*. Особое внимание здесь уделяется тем новшествам, которые вошли в практику эксперимента в течение последних трех — четырех лет. Предметом обсуждения во втором томе стали другие бактериальные, а также эукариотические системы, которые позволяют клонировать гены и осуществлять их экспрессию. На мой взгляд, новичкам в данной области, прежде чем приступить к изучению нашего руководства, полезно составить себе представление о проблеме в целом. Для этого я рекомендую следующие книги: Watson, Tooze, Kurtz «Recombinant DNA: A Short Course»¹; Old, Primrose «Principles of Gene Manipulation» (Blackwell, Oxford, 1985) и мою «Gene Cloning: the Mechanics of DNA Manipulation» (Chapman and Hall, London and New York, 1984). Следует упомянуть также книгу Maniatis, Fritsch, Sambrook «Molecular Cloning»² — превосходное методическое пособие, охватывающее разнообразные практические аспекты технологии рекомбинантных ДНК и молекулярного клонирования в *E. coli*. Надеюсь, что методики клонирования, изложенные в настоящем издании, в должной мере расширят и дополнят материал блестящей книги Маниатиса и его коллег. Методические подходы, описанные в первом томе, включают использование для клонирования векторов на основе бактериофага лямбда и подобных ему лямбдоидных фагов. В первом томе содержатся сведения и о плазмидных векторах, способных обеспечивать синтез составных белков. Такие белки появились не так давно как средство наработки антигенного материала для получения антител к продуктам клонированных генов. Другая многообещающая

¹ Имеется перевод: Уотсон Дж., Туз Дж., Курц Д. Рекомбинантные ДНК. Краткий курс. — М.: Мир, 1986.

² Имеется перевод: Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984.

группа векторов — плазмиды рЕМВL. Они позволяют размножать одноцепочечные фрагменты ДНК в F⁺-бактериях, суперинфицированных специфичным к мужскому типу клеток фагом f1. Обсуждаются два подхода к мутагенезу *in vitro* ДНК, клонированной в таком одноцепочечном векторе. Весьма подробно изложены методы, позволяющие с очень высокой эффективностью трансформировать *E. coli* свободной ДНК.

Второй том посвящен описанию альтернативных систем молекулярного клонирования: бациллам, стрептомицетам, дрожжам. Приводится целый ряд технических приемов, полезных для молекулярных биологов, интересующихся проблемой введения чужеродных генов в растения с помощью векторов на базе Ti-плазмид. Известно, что феномен гибридного дисгенеза у дрозиды может возникнуть в результате микроинъекции Р-элемента. Этот факт послужил толчком к использованию данного транспозона в качестве вектора для молекулярного клонирования. Одна из глав второго тома посвящена методам трансформации клеток зародышевого пути дрозиды. В трех последних главах мы обратились к системам молекулярного клонирования с использованием клеток млекопитающих. Приведены некоторые специальные приемы, позволяющие эффективно осуществлять перенос генов в культивируемые клетки. Обсуждаются две вирусные векторные системы: на основе вируса осповакцины и вируса бычьей папилломы. Материал, изложенный в последних главах, всесторонне знакомит читателя с системами хозяин-вектор, сконструированными на основе животных клеток. Однако эта область экспериментальной молекулярной биологии развивается столь бурно, что через некоторое время для того, чтобы исчерпывающе осветить данную проблему, по всей видимости, понадобится отдельный том.

Я надеюсь, что молекулярные биологи сочтут эти две книги для себя полезными. Я благодарен всем авторам, выразившим желание участвовать в создании настоящего пособия, за то, что они в кратчайший срок подготовили рукопись к печати, а также за их терпимость в общении с придирчивым редактором.

Д. М. Гловер

СПИСОК АВТОРОВ

- C. Baldari*
European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, FRG
- G. Cesareni*
European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, FRG
- G. Ciliberto*
European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, FRG
- R. Cortese*
European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, FRG
- R. W. Davis*
Department of Biochemistry, Stanford University School of Medicine, USA
- L. Dente*
European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, FRG
- F. C. H. Franklin*
Department of Genetics, The University of Birmingham, UK
- H.-J. Fritz*
Max-Planck-Institut für Biochemie, München, FRG
- H.-W. Griesser*
Institut für Genetik, Köln, FRG
- D. Hanahan*
Cold Spring Harbor Laboratory, USA
- T. V. Huynh*
Department of Biochemistry, Stanford University School of Medicine, USA
- B. Müller-Hill*
Institut für Genetik, Universität zu Köln, FRG
- J. F. Jackson*
Department of Biochemistry, Imperial College of Science and Technology, Imperial College Road, London, UK
- K. Kaiser*
University of Glasgow, Institute of Genetics, Glasgow, UK
- R. Karess*
Cancer Research Campaign Eukaryotic Molecular Genetics Research Group, Department of Biochemistry, Imperial College of Science and Technology, Imperial College Road, London, UK
- M. Koenen*
Institut für Genetik, Universität zu Köln, FRG

- N. E. Murray*
University of Edinburgh, Department of Molecular Biology,
King's Buildings, Mayfield Road, Edinburgh, UK
- M. Sollazzo*
European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, FRG
- C. Traboni*
Istituto di Scienze Biochemiche, University of Naples, Naples,
Italy
- C. J. Watson*
Cancer Research Campaign Eukaryotic Molecular Genetics Re-
search Group, Department of Biochemistry, Imperial College
of Science and Technology, Imperial College Road, London, UK
- R. A. Young*
The Whitehead Institute for Biomedical Research and Depart-
ment of Biology, Massachusetts Institute of Technology, Cam-
bridge, USA
- M. S. Campo*
The Beatson Institute for Cancer Research, Garscube Estate,
Switchback Road, Bearsden, Glasgow, UK
- J. Draper*
Department of Botany, Adrian Building, University of Leicester,
Leicester, UK
- C. Gorman*
Cancer Research Campaign, Department of Biochemistry, Im-
perial College of Science and Technology, Imperial College
Road, London, UK
- K. G. Hardy*
Biogen S. A., Geneva, Switzerland
- I. S. Hunter*
Biotechnology Unit, Department of Genetics, University of
Glasgow, Glasgow, UK
- C. P. Lichtenstein*
Department of Biochemistry, Imperial College of Science and
Technology, Imperial College Road, London, UK
- M. Mackett*
Paterson Laboratories, Christie Hospital and Holt Radium In-
stitute, Withington, Manchester, UK
- B. Moss*
Laboratory of Viral Diseases, National Institute of Allergy and
Infectious Diseases, Bethesda, USA
- R. Rothstein*
Department of Human Genetics and Development, Columbia
University, College of Physicians and Surgeons, New York, USA
- G. L. Smith*
Laboratory of Viral Diseases, National Institute of Allergy and
Infectious Diseases, Bethesda, USA

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- APRT — аденинфосфорибозил—трансфераза
ars — автономно реплицирующийся сегмент
BPV-1 — вирус бычьей папилломы I типа
BUdR — 5-бромдезоксисуридин
CAT — хлорамфеникол-ацетил—трансфераза
Cm — хлорамфеникол
DHFR — дигидрофолатредуктаза
DMEM — среда Игла в модификации Дульбекко
DMSO — диметилсульфоксид
FCS — фетальная телячья сыворотка
βgal — β-галактозидаза
gdDNA — двухцепочечная ДНК с одноцепочечными участками
GH — гормон роста
HA — гемагглютинин
HBS — солевой буфер с Hepes
HbsAg — поверхностный антиген вируса гепатита
HSV-1 — вирус простого герпеса I типа
IF — интерферон
IMP — инозинмонофосфат
IPTG — изопропил-1-тио-β-D-галактозид
Km — канамицин
LTR — длинный концевой повтор
MEM — минимальная среда Игла
MES — 2[N-морфин]этансульфоновая кислота
MMTV — вирус опухоли молочной железы мыши
MSV — вирус саркомы Молони
NPTII — неомицинфосфотрансфераза
ONPG — O-нитрофенил-β-D-галактозидаза
ORF — открытая трансляционная рамка
PBS — фосфатно-солевой буфер
PEG — полиэтиленгликоль
RSV — вирус саркомы Рауса
SAM — S-аденозил-L-[метил-³H]метионин
SB — буфер для простой трансформации
SDS — додецилсульфат натрия
Sm — стрептомицин

- Su — сульфонамиды
 T-DNA — трансформирующая ДНК Ti-плазмид
 TBS — трис-солевой буфер
 Tc — тетрациклин
 TES — N-трис(гидроксиметил) метил-2-аминоэтансульфо-
 вая кислота
 TFB — буфер для трансформации
 TK — тимидинкиназа
 X-Gal — 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозид

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВЕКТОРОВ ЗАМЕЩЕНИЯ НА ОСНОВЕ ФАГА ЛЯМБДА ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЬНЫХ БИБЛИОТЕК ГЕНОМНОЙ ДНК

Ким Кайзер и Норин Мюррей

1. Полная библиотека

Полная библиотека генома должна содержать все представляющие этот геном последовательности ДНК в стабильной форме и в не слишком большом числе перекрывающихся клонов. Величина клонированных фрагментов должна быть достаточно велика, чтобы включать в себя полные гены и прилежащие к ним области. С другой стороны, эти фрагменты должны быть достаточно малы, чтобы легко картироваться при помощи рестриктаз. Весьма важно, чтобы библиотеку несложно было получить из небольшого количества исходного материала и в то же время легко проверить на наличие интересующей последовательности, чаще всего при помощи гибридизации с радиоактивными ДНК- или РНК-зондами. Перекрывание между клонами делает возможным «прогулку» по соседним участкам генома. С этой же целью в библиотеке должна быть предусмотрена возможность вырезания ДНК-вставки и отделения ее от последовательностей вектора, с тем чтобы вставка в свою очередь могла использоваться в качестве радиоактивного зонда. В идеале библиотека должна амплифицироваться без потерь и перестроек и храниться в течение нескольких лет без значительного падения титра.

Этим требованиям, хотя бы частично, в настоящее время отвечают лишь векторы на основе фага λ и космид. Космидные векторы обладают большой емкостью (~ 45 т. п. н.), но они менее удобны для работы, чем векторы на основе фага λ , максимальная длина вставки для которых не превышает 20—25 т. п. н. В любом случае библиотека, представляющая сложный эукариотический геном, должна состоять из довольно большого числа индивидуальных рекомбинантов — 10^5 — 10^6 . В настоящее время наиболее эффективными и простыми в работе векторами для стандартного конструирования библиотек геномной ДНК считаются векторы на основе фага λ (сравнительные характеристики космид и λ -векторов обсуждаются в разд. 17).

2. Принципы клонирования в λ -векторах замещения

Обоснованный выбор λ -вектора требует ясного представления о механизмах взаимодействия фага λ с клеткой-хозяином. Однако мы предпочли сначала изложить основные методические принципы конструирования геномных библиотек и лишь затем подробно обсудить те свойства фага λ (разд. 13), которые важны для осознанного использования векторов, полученных на его основе.

Хромосома бактериофага λ представляет собой линейную молекулу ДНК длиной 48,6 т.п.н. [3], при этом установлено, что почти 40% генома не являются обязательными для размножения фага. В результате множества манипуляций *in vivo* и *in vitro* сейчас в нашем распоряжении имеется большое количество λ -векторов для размножения чужеродной ДНК, вот почему выбор подходящего вектора может вызвать затруднения [1, 2, 4, 5, 6, 7, 8]. Здесь мы рассмотрим только векторы, относящиеся к классу векторов замещения, в особенности те из них, которые способны включать крупные фрагменты чужеродной ДНК и таким образом сводить к минимуму число рекомбинантов, необходимых для построения полной библиотеки генома.

Стратегия использования любого из векторов замещения приведена на рис. 1. При расщеплении векторной ДНК подходящей рестриктазой образуются три фрагмента (рис. 1, А): два из них, левое плечо и правое плечо, вместе содержат всю генетическую информацию, необходимую для образования инфекционной фаговой частицы; кроме того, в состав вектора входит центральный фрагмент. Центральный фрагмент не содержит необходимых для размножения генов и служит просто для «подгонки» длины векторной ДНК. Векторы замещения названы так именно потому, что центральные фрагменты их ДНК могут быть замещены фрагментами чужеродной ДНК. В фаговую частицу с высокой эффективностью могут быть упакованы сегменты ДНК длиной от 40 до 50 т.п.н. Лигирование двух плечей вектора приводит к образованию молекулы ДНК, длина которой недостаточна для упаковки, что в свою очередь обуславливает обогащение фаговой популяции рекомбинантами.

Фрагменты ДНК, полученные в результате расщепления рестриктазой (рестрикты), имеют комплементарные «липкие концы» (рис. 1, А). Если такие рестрикты смешать с фрагментами чужеродной ДНК, тоже имеющими липкие концы, и добавить ДНК-лигазу, то часть вновь образовавшихся молекул вектора между правым и левым плечами будет содержать фрагмент чужеродной ДНК. Если такую рекомбинантную молекулу ДНК ввести в бактериальную клетку, последняя лизируется и даст начало клону фаговых частиц. Негативные колонии (фаговые бляшки), образовавшиеся в результате лизиса индиви-

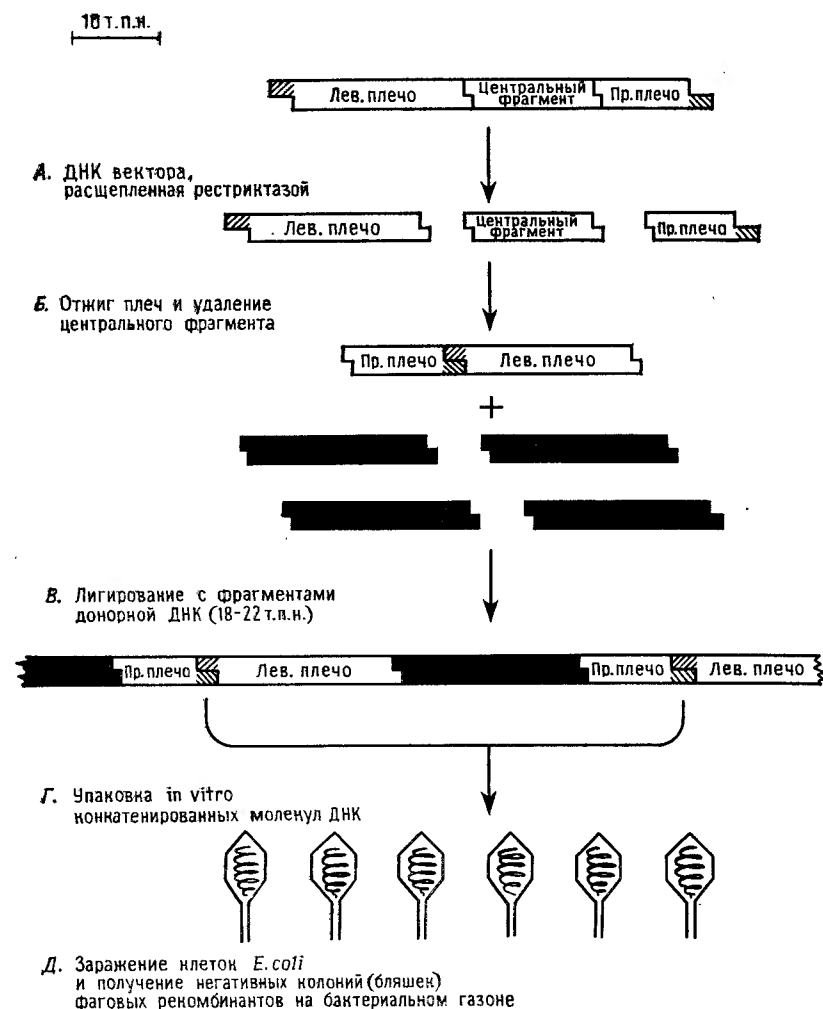


Рис. 1. Стратегия клонирования с использованием λ -векторов замещения. При расщеплении ДНК вектора подходящим ферментом образуются липкие концы, к которым при помощи лигазы присоединяются имеющие комплементарные концы фрагменты донорной ДНК. Заштрихованные области обозначают собственные липкие концы фага λ . Как показано на рисунке, липкие концы фага отжигают перед лигированием. Конкатенированный продукт реакции лигирования упаковывают *in vitro* в инфекционные фаговые частицы, каждая из которых, размножаясь, образует бляшку на газоне бактерий. Реплику (отпечаток) поверхности чашки с фаговыми бляшками можно получить, накладывая на поверхность этой чашки нитроцеллюлозный фильтр (разделы 9 и 18.10).

Впоследствии фильтр используют для гибридизации с ДНК-зондом.

дуальной зараженной бактерии, будут содержать амплифицированные рекомбинантные хромосомы, несущие соответствующую последовательность из популяции донорных фрагментов.

Эта простая процедура несколько усложняется вследствие того, что на концах самой векторной молекулы ДНК имеются комплементарные одноцепочечные участки (липкие концы) (рис. 1, А). Их существование делает возможным отжиг левого и правого плечей фага друг с другом (рис. 1, Б). При этом образуются конкатенированные молекулы рекомбинантной ДНК, состоящие из многих геномов (рис. 1, В). Из такой конкатенированной молекулы, однако, нетрудно получить вновь мономерные геномы (разд. 4.1 и 13.1).

Молекулы фаговой ДНК, как рекомбинантные, так и нативные, можно ввести в бактериальную клетку в виде свободной ДНК (трансфекция) с эффективностью $>10^4$ рекомбинантных клонов на 1 мкг донорной ДНК. Такой эффективности достаточно для конструирования и размножения библиотек небольших геномов (например, геномов *E. coli* или дрожжей). При работе с большими геномами для того, чтобы количество исходного материала не было лимитирующим фактором, а также для достижения высокой плотности рекомбинантных бляшек на чашке желательна более высокая эффективность. Если перед введением в бактериальные клетки молекулы рекомбинантной ДНК *in vitro* «упаковать» в частицы фага, можно добиться эффективности более чем 10^6 рекомбинантных клонов на 1 мкг донорной ДНК (рис. 1, Г).

Для получения полных библиотек высокомолекулярную геномную ДНК фрагментируют с помощью рестриктазы, для которой среднее расстояние между сайтами узнавания мало по сравнению с желаемым размером вставки, а липкие концы совместимы с вектором. В результате получают набор перекрывающихся фрагментов ДНК, который в первом приближении представляет весь геном. В рекомбинантных клонах будут представлены лишь те чужеродные фрагменты, которые образуют рекомбинантные молекулы фаговой ДНК, подходящие по размерам для упаковки. Это требование удовлетворяется либо при включении в состав рекомбинантной молекулы одного крупного фрагмента ДНК, либо нескольких меньшего размера (множественная вставка). Такие множественные вставки нежелательны, так как входящие в их состав фрагменты могут и не соседствовать в исходном геноме, что создает трудности при анализе рекомбинантных молекул. Во избежание этого экзогенные молекулы ДНК обычно фракционируют по размеру и в реакцию лигирования вводят лишь те молекулы, которые имеют достаточно большой размер. В таком случае при множественной вставке образуются фаговые геномы, не способные к упаковке из-за слишком большой длины.

Если исходный центральный фрагмент не удалить после расщепления векторной ДНК и перед лигированием, то часть образовавшихся молекул фаговой ДНК вновь включит его в свой состав. Чтобы этого не произошло, нужно перед лигированием отделить центральный фрагмент от плеч вектора (рис. 1, Б). Тогда любой жизнеспособный фаговый геном, образовавшийся при лигировании, будет содержать фрагмент чужеродной ДНК, а библиотека (теоретически) не будет загрязнена последовательностями родительского фага. Выделять ДНК плеч фага в чистом виде необязательно, если используемый вектор допускает генетическую селекцию против нереконбинантных фагов в процессе размножения библиотеки (разд. 14 и 15).

В следующем разделе мы рассмотрим подробно все этапы приведенной выше общей схемы. Так как многие из применяемых нами методов с достаточной полнотой описаны в других руководствах, мы будем отсылать читателя к этим источникам [1, 2]. В данной главе особое внимание уделено тем этапам клонирования, на которых исследователя подстерегают ловушки, и предложены методы, помогающие их обойти. В особенности хотелось бы указать на важность постановки во всех возможных случаях контрольных экспериментов, позволяющих судить об успешном проведении каждой стадии клонирования.

3. Донорные и векторные ДНК

3.1. Выделение донорной ДНК

Донорная ДНК вне зависимости от источника должна удовлетворять основному требованию: ее молекулярный вес должен быть очень велик. Как правило, при выделении ДНК из клеток она несколько деградирует вследствие механических воздействий на нее в процессе выделения и расщепления ферментами, высвобождающимися при разрушении клеток. Эту деградацию необходимо сводить к минимуму, в особенности если набор донорных фрагментов ДНК предполагается получать при помощи частичного расщепления рестриктазами, так как в противном случае значительная часть фрагментов не будет иметь липких концов. Такие фрагменты, непродуктивно соединяясь с фрагментами векторной ДНК, будут затруднять клонирование, поскольку к ним будет присоединяться лишь одно из двух необходимых для образования инфекционной рекомбинантной молекулы плеч фага. Кроме того, обычным субстратом для упаковки в инфекционные фаговые частицы *in vitro* служат конкатенированные молекулы фаговой ДНК (рис. 1, В, разд. 4.1). Молекулы же с «оторванным» концом будут останавливать рост цепи и, следовательно, затруднять как реакцию лигирования, так и упаковку.

Все вышесказанное может быть не особенно важным при работе с небольшими геномами (например, геном *E. coli* можно с достаточной полнотой представить библиотекой из 1000 индивидуальных рекомбинантов со вставкой длиной 20 т. п. н.), однако играет большую роль при конструировании сложных эукариотических библиотек, включающих до миллиона рекомбинантов. Эти обстоятельства необходимо учитывать и тогда, когда количество донорной ДНК ограничено. Как правило, для клонирования с высокой эффективностью средний размер донорной ДНК должен существенно превосходить 100 т. п. н.

Идеальный метод выделения ДНК должен содержать минимальное число стадий и полностью исключать механическое дробление и ферментативную деградацию ДНК. Обычно механическое дробление ДНК происходит при излишнем энергичном перемешивании вязких ее растворов, особенно при использовании многократных экстракций фенолом или другими органическими растворителями. Большинство методик выделения высокомолекулярной ДНК включает суспендирование сферопластов (для прокариот) или эукариотических ядер в стабилизирующем буфере и последующее добавление лизирующего реагента, переводящего ДНК в раствор. Использование для лизиса сильных детергентов позволяет не только сольubilизировать ДНК, но и подавить эндогенную ДНКазную активность.

Механические методы (например, гомогенизация) допустимы лишь до стадии лизиса. После лизиса раствор из-за присутствия высокомолекулярной ДНК становится вязким. Начиная с этой стадии, необходимо свести к минимуму все механические воздействия (перемешивание, встряхивание, продавливание через пипетки или иглы шприца), а число стадий, на которых возможно дробление, сделать по возможности небольшим. Смешивание при экстракции фенолом необходимо проводить осторожно (раздел 18.4)! Так как с высококонцентрированными и, следовательно, вязкими растворами ДНК работать весьма трудно, обычно предпочитают умеренные концентрации ДНК (<1 мг на 20 мл ядерного лизата) и в соответствии с этим выбирают количества исходного материала.

Метод, в который не входят экстракция фенолом и осаждение этанолом, а очистка и концентрирование ДНК проводятся одновременно при помощи равновесного центрифугирования в градиенте хлорида цезия (CsCl), описан в разд. 18.4. Этот метод, представляющий собой модификацию ранее описанного [27], был успешно использован для выделения высокомолекулярной ДНК из бактерий, грибов, дрожжей, культивируемых клеток млекопитающих и тканей млекопитающих. Метод быстр, содержит минимальное число стадий и доступен исследователю, не имеющему большого опыта работы с высокомолекулярной ДНК.

3.2. Фракционирование донорной ДНК

Истинно случайное распределение фрагментов в библиотеке может быть достигнуто только тогда, когда ДНК фракционируют методом, не зависящим от нуклеотидной последовательности, например путем контролируемого механического дробления [9]. Удобнее, однако, фракционировать ДНК при помощи частичного расщепления рестриктазой. Если выбранный фермент расщепляет ДНК до относительно небольших фрагментов (в сравнении с желаемым размером клонируемых фрагментов), обработка рестриктазой позволяет получить набор перекрывающихся фрагментов, в достаточной степени случайный для большинства целей. Тем не менее невозможно гарантировать, что во фрагментах желаемой длины будут присутствовать все участки генома, так как некоторые протяженные области генома могут, например, вообще не содержать участков расщепления. Более того, не все участки расщепления атакуются ферментом с равной эффективностью.

Чаще всего используют рестриктазы *Sau3A* и *MboI* вследствие их совместимости с *BamHI* (разд. 3.3). Оба фермента узнают тетра-нуклеотидную последовательность (GATC), которая повторяется в среднем через каждые 4⁴ (256) пар оснований в случайной последовательности ДНК. Таким образом, для получения фрагментов длиной 20 т. п. н. необходимо расщепить лишь 1/80 доступных участков. Однако эта цифра зависит от GC-состава используемой донорной ДНК, поэтому оптимальную концентрацию фермента определяют эмпирически при помощи пробных реакций (рис. 2, разд. 18.5).

При оптимальных условиях максимум распределения фрагментов по размеру должен попасть в нужную область (18—22 т. п. н. для описываемых здесь векторов). Тем не менее в таком препарате будет содержаться и небольшое количество коротких фрагментов. Если эти фрагменты не удалить, они могут включиться в вектор и присутствовать в нем в виде множественных вставок. Длинные фрагменты, с другой стороны, могут оказаться слишком большими для упаковки. Кроме того, рекомбинантные молекулы ДНК, близкие по размеру к верхнему и нижнему пределам упаковки, могут подвергаться Рес-зависимым делециям и дупликациям или Рес-независимым делециям и перестройкам (разд. 16.2). Фрагменты нужного размера можно отделить от остальных при помощи центрифугирования в градиентах плотности хлористого натрия или сахарозы (разд. 18.6) либо электрофорезом в агарозном геле [7]. Первый метод позволяет получить ДНК, более пригодную для лигирования, так как агарозу и другие примеси, ингибирующие лигазу, иногда трудно удалить из препаратов ДНК, выделенной из геля. Диапазон длин фрагментов, присутствующих в каждой из фрак-

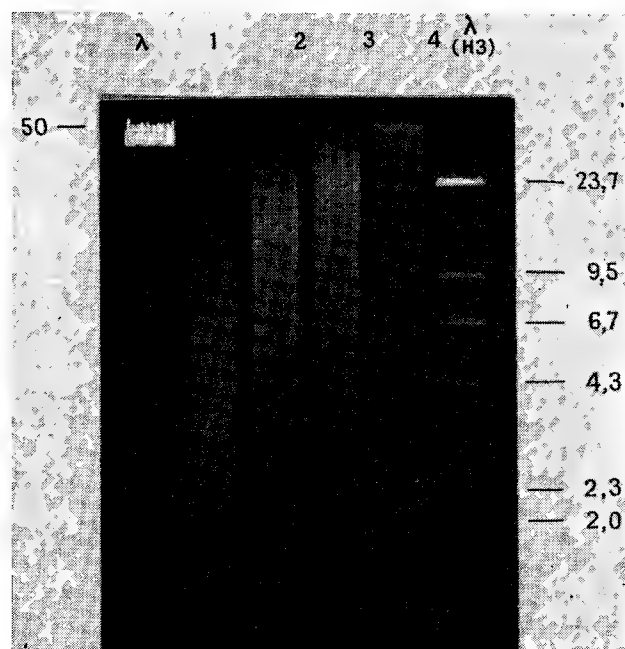


Рис. 2. Частичное расщепление высокомолекулярной ДНК *Sau3A*. Серия пробных реакций проводилась так, как описано в разделе 18.5. ДНК рестрицировали, используя концентрации фермента, близкие к оптимальной, затем разделяли электрофорезом в 0,3%-ной агарозе при 20 В в течение ночи. На рисунке приведена фотография геля после окраски этидиумбромидом. Маркерами служили интактная ДНК фага λ и λ -ДНК, рестрицированная *HindIII*. Образцы λ -ДНК перед нанесением прогревали в течение 10 мин при 68 °С для диссоциации их липких концов. В препаративной реакции рестрицировали 200 мкг высокомолекулярной ДНК: половину объема в условиях, соответствующих дорожке 2, а половину — в условиях, соответствующих дорожке 3. Отметим, что некоторая часть ДНК относительно устойчива к расщеплению *Sau3A*. Эта ДНК, мигрирующая, как видно на рисунке, позади интактной ДНК фага λ , не может быть клонирована ни с помощью фага λ , ни с помощью космидных векторов.

ций солевого или сахарозного градиентов, определяют при помощи электрофореза в 0,3%-ном агарозном геле (рис. 3), и фракции, содержащие фрагменты нужного размера, собирают для дальнейшей проверки. Количество ДНК в каждой из фракций оценивают визуально по флуоресценции интеркалирующего красителя — этидиумбромид (разд. 18.6). ДНК, присутствующую во фракциях градиента, перед клонированием необходимо сконцентрировать; обычно это делают при помощи осаждения этанолом. При осаждении малых количеств ДНК этанолом (разд. 18.2) могут происходить неконтролируемые потери, поэтому количество ДНК во фракциях следует определять *после* их концентри-

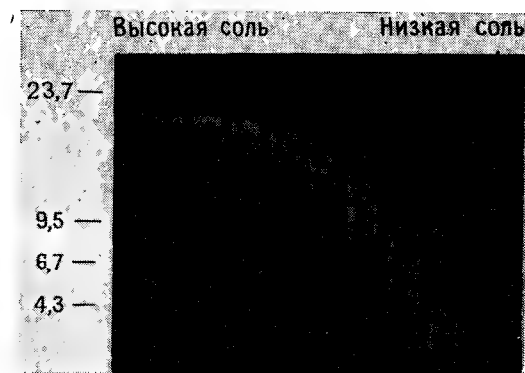


Рис. 3. Электрофоретический анализ донорной ДНК, частично расщепленной *Sau3A* и фракционированной в градиенте концентрации соли. Частично рестрицированную ДНК фракционировали, как описано в разделах 3.2 и 18.6; аликвоты анализировали в 0,3%-ном агарозном геле, как указано в подписи к рис. 2.

рования. Альтернативный метод заключается в обработке частично расщепленной ДНК фосфатазой (см. замечания при проверке препаратов фосфатазы в разд. 18.3) и последующем лигировании с расщепленным вектором. Лигаза не способна соединить две молекулы ДНК, если обе они лишены 5'-концевых фосфатных групп. Таким образом, обработанные фосфатазой фрагменты донорной ДНК не могут образовывать множественные вставки. Останется еще некоторая часть рекомбинантных молекул ДНК, слишком длинных либо слишком коротких для упаковки, и отбор нужных по длине фрагментов выпадает на долю экстракта для упаковки *in vitro* (разд. 4.2). Размер фрагмента, способного к упаковке, может варьировать в значительных пределах (описанные здесь векторы пригодны для клонирования фрагментов от 9 до 22 т. п. н.), вот почему сконструированные таким способом библиотеки будут содержать больше рекомбинантов, чем необходимо для представления полного генома, в особенности если используются упаковочные экстракты, не накладывающие сильных ограничений на малые рекомбинантные молекулы. Следует отметить, что этот метод приводит к появлению рекомбинантных геномов, близких по размеру к верхнему и нижнему пределам упаковки и вследствие этого потенциально нестабильных. Появления таких геномов (по крайней мере близких к нижнему пределу упаковки) можно избежать, подобрав подходящие упаковочные экстракты и буферы (разд. 4.2).

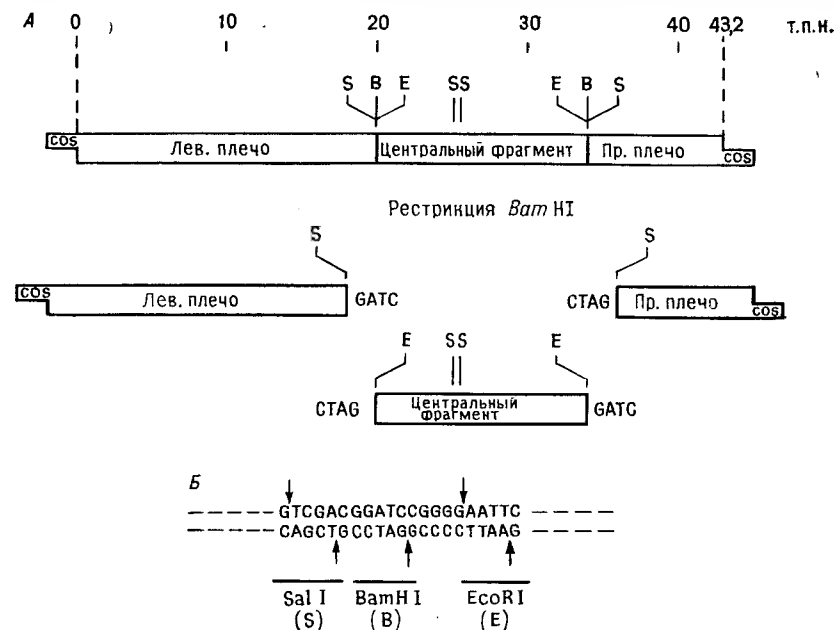


Рис. 4. А. Молекула ДНК типичного вектора замещения EMBL3. Центральный фрагмент окружен полилинкерами (Б) в инвертированной ориентации. Центральный фрагмент содержит два сайта рестрикции для *Sal*I, а полилинкеры — сайты для *Sal*I (S), *Bam*HI (B) и *Eco*RI (E). Следовательно, EMBL3 пригоден для клонирования фрагментов ДНК с концами, комплементарными концам, образующимся при действии любого из этих ферментов. Одноцепочечные выступы длиной в 4 нуклеотида, появляющиеся при действии рестриктазы *Bam*HI (GATC), дают возможность лигировать с этим вектором фрагменты донорной ДНК, образующиеся при частичном расщеплении *Sau*3A. Сохраняющиеся в плечах сайты для *Sal*I позволяют вырезать фрагмент-вставку с минимальным захватом последовательностей векторной ДНК. Присутствие сайтов для *Eco*RI обеспечивает возможность инактивировать центральный фрагмент перед лигированием с донорными фрагментами. Cos — обозначает липкие концы фага λ . Б. Последовательность ДНК, соответствующая области полилинкера EMBL3.

3.3. Векторная ДНК

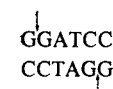
Структура молекулы ДНК типичного вектора замещения (EMBL3) приведена на рис. 4, А. Центральный фрагмент окружен двумя необходимыми для размножения фага последовательностями. Левое плечо кодирует белки вириона, а правое — участок начала репликации, основные промоторы и ряд других важных генов. ДНК изображена в линейной форме, т. е. именно в той форме, в какой ее выделяют из фаговых частиц. На своих концах оба плеча несут короткие (12 нуклеотидов) комплементарные одноцепочечные участки (*cos*). Их называют *липкими*

концами (*cohesive ends*). Наличие таких концов позволяет геному фага λ после инфекции замыкаться в кольцо; при упаковке ДНК в фаговые частицы липкие концы образуются вновь.

Центральный фрагмент EMBL3 окружен полилинкерами (рис. 4, Б) в противоположных ориентациях:

*Sal*I-*Bam*HI-*Eco*RI—центральный фрагмент—*Eco*RI-*Bam*HI-*Sal*I.

В состав полилинкеров, длина которых менее 40 п. н., входят сайты узнавания для этих трех ферментов, единственные во всей молекуле вектора (за исключением двух дополнительных участков *Sal*I в центральном фрагменте), поэтому любой из этих ферментов может быть использован для клонирования. Вектор, однако, предназначен специально для клонирования в сайте *Bam*HI. Эта рестриктаза расщепляет (с образованием липких концов) шестинуклеотидную последовательность:



Любая шестинуклеотидная последовательность, однако, встречается в случайной последовательности ДНК лишь в среднем через каждые 4⁶ (4096) пар нуклеотидов, что слишком редко для «случайного» расщепления донорной ДНК. Однако центральная часть последовательности, узнаваемой *Bam*HI:



представляет собой сайт узнавания (точки расщепления указаны стрелками) для рестриктаз *Sau*3A и *Mbo*I. Таким образом, расщепленная с помощью *Bam*HI ДНК EMBL3 может акцептировать экзогенные фрагменты ДНК, полученные при частичном расщеплении рестриктазами *Sau*3A или *Mbo*I (разд. 3.2 и 18.5). Образующиеся рекомбинантные вставки будут окружены с обеих сторон (фланкированы) расщепления для *Sal*I, что позволяет точно отделить эти вставки от плеч вектора и использовать в качестве зонда для поиска перекрывающихся или родственных рекомбинантных фагов в библиотеке (разд. 12).

Все сказанное относится и к другим описанным здесь векторам, хотя структура линкеров в них может быть другой (см. рис. 8). Все линкеры содержат сайт расщепления для *Bam*HI, с обеих сторон которого расположены сайты узнавания для общедоступных рестриктаз. Кроме того, все эти векторы могут использоваться и для клонирования фрагментов, полученных с применением других ферментов (для EMBL3, например, это *Eco*RI и *Sal*I). Такой подход может оказаться полезным, если

известно, что искомая последовательность входит в состав *EcoRI*- или *Sall*-фрагментов подходящей длины (9—22 т. п. н.). Однако по-настоящему представительную и, следовательно, применимую для многих целей библиотеку таким способом получить нельзя.

Качество векторной ДНК (его легче проконтролировать) играет не менее важную роль, чем качество донорной ДНК. Известно несколько методов получения фаговых частиц в больших количествах (≥ 100 мкг) (см. работы [1] и [2]). При выделении вектора, так же как и при выделении донорной ДНК, не следует увлекаться количеством исходного материала. С получающимися при этом концентрированными и, следовательно, вязкими растворами ДНК трудно работать. Кроме того, даже после многократной экстракции фенолом эта ДНК хуже поддается расщеплению ферментами. Наиболее чистые препараты фагов получают путем двукратного центрифугирования в градиенте плотности CsCl . После удаления CsCl диализом концентрат фага разбавляют и для освобождения фаговой ДНК несколько раз осторожно экстрагируют фенолом или смесью фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1) [6]. Фенол следует удалять интенсивным диализом, а не с помощью осаждения и промывки этанолом, так как осадок конкатенированной ДНК труднорастворим. Следует тщательно поддерживать стерильность растворов фаговой ДНК, так как ее одноцепочечные липкие концы весьма подвержены деградации, а их целостность необходима при клонировании.

Векторную ДНК перед клонированием необходимо проверить несколькими методами. Особое внимание следует обратить на пункты, перечисленные в разд. 18.7.

3.4. Удаление центрального фрагмента

Если генетическая селекция против нерекомбинантных фагов невозможна или нежелательна, из препарата рестрицированной векторной ДНК перед лигированием с фрагментами донорной ДНК можно эффективно удалить центральный фрагмент. Подавляющая часть жизнеспособных фаговых геномов после этого окажется рекомбинантной.

Отделение плеч вектора от его центрального фрагмента можно осуществить либо при помощи фракционирования в градиентах хлористого натрия или сахарозы, либо посредством элюции или экстракции из агарозного геля. По причинам, указанным в разд. 3.2, мы предпочитаем первый метод. При любом методе выделения необходимо тщательно проследить, чтобы плечи вектора были соединены между собой через липкие концы (рис. 1, разд. 18.8). В этом случае выделять придется единственный фрагмент ДНК (состоящий из правого и левого плеч), который

благодаря большому размеру легко отделяется от центрального фрагмента. Методику очистки ДНК плеч фага можно найти в работе [2].

Для EMBL3 существует и другой метод [6]. К участкам *Bam*HI этого вектора с внутренней стороны прилегают сайты *Eco*RI (см. рис. 4). При совместной обработке рестриктазами *Bam*HI и *Eco*RI (двукратное расщепление) с обоих концов центрального фрагмента отщепляются короткие (< 10 п. н.) фрагменты *Bam*HI-*Eco*RI. В этом случае центральный фрагмент оказывается неспособным конкурировать с фрагментами донорной ДНК при лигировании с плечами вектора. Более того, если для осаждения векторной ДНК вместо этанола использовать изопропанол, короткие фрагменты остаются в растворе (см. разд. 18.8). Метод двойного расщепления, однако, применим не всегда, так как многие векторы не имеют расположенных нужным образом сайтов рестрикции. Кроме того, даже если два фермента используются одновременно (в таком случае их требования к буферу и кофакторам должны быть совместимы), любая данная последовательность полилинкера будет расщепляться сначала одним из них. Второй фермент должен будет расщеплять участок, расположенный очень близко к концу молекулы ДНК (в вышеприведенном случае — ближе 10 п. н.). Ряд ферментов, например некоторые партии *Sall*, рестрицируют близкие к концу участки с низкой эффективностью. Для любой пары ферментов возможность использования этого метода необходимо проверять экспериментально (см., однако, работу [10]). ДНК вектора EMBL3 следует сначала обработать *Bam*HI, затем довести ионную силу буфера до нужного для *Eco*RI значения и обработать трехкратным избытком этого фермента. При удалении центрального фрагмента важно проконтролировать число фаговых частиц, образующихся при лигировании векторной ДНК на себя. Не следует считать, что они полностью отсутствуют. Для некоторых целей может оказаться необходимым свести их число к абсолютному минимуму. Для EMBL3 и EMBL4 можно удалить (или инактивировать) центральный фрагмент и одновременно провести селекцию против родительского фага (разд. 14 и 15).

4. Рекомбинация и упаковка

В большинстве случаев инфекционные частицы получают при помощи упаковки рекомбинантных молекул ДНК *in vitro*, поскольку именно фаговая инфекция является наиболее эффективным способом введения ДНК фага в бактериальные клетки. Трансфекция — менее эффективный, но более простой метод — будет обсуждаться в разделе 4.3.

При упаковке *in vitro* можно получить более 10^8 инфекционных фаговых частиц фага на 1 мкг λ -ДНК. Такая эффективность позволяет получать более 10^6 рекомбинантных молекул на 1 мкг донорной ДНК. Упаковку *in vitro* производят при помощи «упаковочных экстрактов», для приготовления которых индуцируют клетки *E. coli*, лизогенные по некоторым мутантам фага λ . Экстракт содержит все структурные белки, необходимые для упаковки λ -ДНК в инфекционную фаговую частицу. Экстракты представляют собой коммерческие препараты, которые могут сохраняться при -70°C . Методики их приготовления выходят за рамки этой главы. С ними читатель может ознакомиться в работах [1] и [2].

4.1. Реакция лигирования

Убедившись в пригодности препаратов рестрицированной векторной ДНК, достаточное количество которой составляет 20—50 мкг, необходимо определить оптимальные концентрации векторной и донорной ДНК в реакции лигирования. Как конкатенированные, так и в несколько меньшей степени линейные молекулы λ -ДНК являются хорошими субстратами для упаковки *in vitro*, тогда как мономерные кольца не упаковываются. Условия лигирования, выбранные так, как описано в разд. 18.9, благоприятствуют образованию длинных конкатенированных молекул ДНК. Для этого требуется, чтобы плечи вектора были отожджены перед лигированием (рис. 1) и чтобы реакция проводилась при относительно высокой концентрации ДНК (см. разд. 4.3).

Теоретически возможно [2] рассчитать а priori концентрацию участвующих в реакции молекул ДНК, оптимальную для образования нужного продукта лигирования. На практике, однако, часть молекул имеет нарушенные липкие концы или другие повреждения. Кроме того, хотя концентрацию векторной ДНК можно измерить довольно точно, количество донорной ДНК может быть определено лишь визуально по флуоресценции этидиумбромидом, а этот метод не очень точен. Учитывая эти сложности, часто оказывается удобным оптимальные концентрации находить эмпирически, используя теоретические значения в качестве отправной точки. Простейший подход состоит в независимом анализе каждой из переменных в серии пробных реакций, как это описано в разд. 18.9.

4.2. Реакция упаковки

Длина ДНК, упаковывающейся в головку фага, ограничена как сверху (~ 52 т. п. н), так и снизу (~ 40 т. п. н). Варьируя методику приготовления упаковочного экстракта, можно изме-

нить эффективность, с которой пакуются небольшие (~ 40 т. п. н) геномы по отношению к геномам нормального размера [2, 11]. По методике II [2] получают экстракты, осуществляющие довольно жесткую селекцию молекул ДНК, близких по размеру к геному λ дикого типа (т. е. вставки длиной ~ 20 т. п. н. при длине плеч 30 т. п. н). Эта методика оказывается полезной при работе со вставками наибольшего возможного размера, особенно если при получении донорных фрагментов не использовалось фракционирование. Более широкий спектр вставок, включающий вставки минимально возможной длины, можно получить с использованием методики I [2]. Сама по себе эта методика менее эффективна, чем методика II, однако при ограниченном количестве донорной ДНК с ее помощью можно получить максимальный выход рекомбинантов. Большая часть коммерческих экстрактов принадлежит к типу с жестким отбором.

4.3. Трансфекция

Коммерческие упаковочные экстракты весьма дороги. Библиотеки прокариотических геномов можно получать при помощи трансфекции (введения в бактериальную клетку свободной фаговой ДНК). Желательный субстрат для трансфекции — это мономерная молекула фаговой ДНК. Оптимальные условия лигирования для трансфекции, таким образом, отличаются от условий, необходимых для упаковки *in vitro*.

Даже не учитывая концентрации ДНК, при выборе условий лигирования необходим компромисс. T_m для липких концов, образующихся при действии рестриктаз (4 нуклеотида), равна примерно 5°C . (T_m — это температура, при которой половина комплементарных оснований нуклеиновой кислоты в растворе отожджена). Обычно используемые ДНК-лигазы хорошо работают при 37°C и малоактивны при 5°C . В условиях значительного избытка лигазы при температуре 10 — 16° лигирование проходит с приемлемой скоростью (от минут до часов). Отжиг липких концов фага λ , требующий более высокой энергии активации, будет далек от равновесия после короткой реакции при низкой температуре. Таким образом, если ДНК плеч диссоциировать перед началом реакции (прогрев 10 мин при 68°C и быстрое охлаждение во льду), основным продуктом лигирования будут линейные мономерные рекомбинантные молекулы ДНК, пригодные для трансфекции [11, 15]. Напротив, чтобы оптимизировать образование конкатенированных молекул, ДНК плеч необходимо заранее отжечь (разд. 18.9). В любом случае лигирование проводят при высокой концентрации ДНК, чтобы преимущественно происходило соединение молекул, а не внутримолекулярная циклизация.

5. Препаративная реакция

После того как определены условия лигирования, необходимо провести препаративную реакцию, чтобы получить нужное для полной библиотеки число рекомбинантных фагов и упаковать лигированную ДНК с наибольшей возможной эффективностью. К сожалению, эффективность, получаемая в аналитических опытах, достигается на этой решающей стадии редко, поэтому не стоит вкладывать всю имеющуюся фракционированную ДНК в один эксперимент.

Например эффективность, с которой различные партии упаковочных экстрактов пакуют молекулы фаговой ДНК, может не строго линейно зависеть от концентрации ДНК, особенно при высоких ее концентрациях. Если необходимо использовать содержимое нескольких пробирок с экстрактом, их следует использовать по-отдельности, так как объединение их обычно ведет к уменьшению эффективности (Дж. Вольф, личное сообщение). Лучше работать не более чем с двумя-тремя пробирками сразу, так чтобы экстракт не успевал полностью растаять при смешивании с ДНК.

После упаковки добавьте в пробирку каплю хлороформа, определите титр упакованного фага и храните библиотеку при 4°C. Избыток упаковочного экстракта может подавлять рост бактерий. Если титр библиотеки очень мал и необходимое для скрининга (разд. 9) или амплификации (разд. 8) число бляшек можно получить лишь при нанесении на чашку 1/10—1/4 объема упакованного фага, следует сконцентрировать упакованный фаг центрифугированием в градиенте CsCl [1, 2]. Условия длительного хранения фага λ описаны в работах [1, 2, 15]; заметим, однако, что фаг, упакованный *in vivo*, дольше сохраняет жизнеспособность, чем препарат, полученный *in vitro*.

Несмотря на эти трудности, библиотеки фага λ , насчитывающие больше 10^6 рекомбинантов, можно без особых затруднений получать из небольшого количества исходного материала, хотя, имея в виду сказанное выше, их скрининг и амплификацию следует проводить возможно быстрее.

6. Необходимый размер библиотеки

Считая, что выбор последовательности-вставки случаен, что все фрагменты донорной ДНК имеют одинаковую длину, и зная размер генома, нетрудно определить размер библиотеки, с заданной вероятностью включающей выбранную последовательность ДНК. На практике, хотя ни один из приведенных выше параметров точно не известен, можно получить приближенную цифру, достаточную для большинства случаев.

Таблица 1. Число (N) независимых рекомбинантных молекул ДНК, которые должны быть включены в фаговый вектор замещения или в космиду для того, чтобы с вероятностью 99% клонировать уникальную последовательность ДНК

Организм	Приблизительное содержание ДНК в гаплоидном геноме, п. н.	N для вставки длиной 20 т. п. н. ¹⁾	N для вставки длиной 45 т. п. н. ¹⁾
<i>Escherichia coli</i> (бактерия)		$4,2 \cdot 10^6$	$9,2 \cdot 10^2$
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (дрожжи)		$1,4 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^3$
<i>Drosophila melanogaster</i> (плодовая мушка)		$1,4 \cdot 10^8$	$1,4 \cdot 10^4$
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i> (морской еж)		$8,6 \cdot 10^8$	$2,0 \cdot 10^5$
<i>Homo sapiens</i> (человек)		$3,3 \cdot 10^9$	$7,6 \cdot 10^5$
<i>Triticum aestivum</i> (гексаплоидная пшеница)		$1,7 \cdot 10^{10}$	$3,9 \cdot 10^6$

¹⁾ Расчеты выполнены в предположении, что расщепление донорной ДНК случайно, что не вполне строго выполняется при неполном гидролизе *Sau3A* или *MboI*. Цифры, однако, достаточно точны для большинства случаев.

Если «х» — размер вставки, а «у» — размер гаплоидного генома (в одних и тех же единицах), то библиотека из

$$N = \frac{\ln(1 - p)}{\ln(1 - x/y)}$$

клонов будет с вероятностью «р» содержать любую выбранную последовательность ДНК [12]. Полагая, что размер вставки равен 20 т. п. н. и выбрав $p=0,99$, получим цифры, приведенные в табл. 1. Для сравнения приведен размер библиотеки, необходимый при клонировании вставок длиной 45 т. п. н. в космидном векторе. Следует отметить, что для клонирования гетерозиготных последовательностей негаплоидных организмов требуются большие библиотеки.

7. Работа с ограниченным количеством донорной ДНК

Описанные выше процедуры удобно проводить с относительно большими количествами исходного материала (>100 мкг высокомолекулярной ДНК). 5—10 мкг понадобятся для определения оптимальных условий частичного расщепления рестриктазой. Значительная часть частично расщепленного материала не попадает в желаемый диапазон размеров. Потери могут про-

исходить и на других этапах, например при диализе и осаждении этанолом фракций солевого градиента. Более того, некоторые партии рестриктаз могут (и не так уж редко) характеризоваться побочными нуклеазными активностями, которые еще более снижают выход рекомбинантной ДНК. Наконец, свойства препаратов векторной ДНК и упаковочных экстрактов могут значительно меняться от партии к партии. Если количество исходного материала не лимитирует исследователя, на некоторые из этих потенциальных трудностей можно не обращать внимания.

Существует возможность конструировать библиотеки, имея много меньшие количества ДНК, выделенной, например, из такого невозобновляемого источника, как небольшая опухоль. Считая, что все этапы клонирования проходят с максимальной эффективностью и без потерь, для библиотеки из более чем 10^6 рекомбинантов достаточно 1 мкг фракционированной по размеру ДНК [6]. Такая эффективность, к сожалению, может быть достигнута очень редко.

Как уже отмечалось, выделение геномной ДНК следует проводить с максимальной тщательностью. Метод, описанный в разд. 18.4, можно использовать для выделения всего 10—20 мкг пригодной для клонирования ДНК. Поскольку использовать эту ДНК для определения условий частичного расщепления было бы расточительно, условия эти подбирают, манипулируя с другой, более доступной ДНК, выделенной тем же способом. Затем при выбранных условиях расщепляют часть интересующей нас ДНК и аликвоту (~0,5 мкг) анализируют в 0,3%-ном агарозном геле. При необходимости условия изменяют и расщепляют остаток препарата, намеренно ошибаясь в безопасную сторону. Реакцию останавливают быстрым замораживанием (а не ЭДТА или фенолом), чтобы при необходимости можно было внести дополнительное количество фермента.

Максимальной эффективности можно добиться, обрабатывая фрагменты ДНК фосфатазой, используя их непосредственно для лигирования с подходящей векторной ДНК (разд. 3.2) и проводя упаковку в условиях, благоприятствующих включению в состав рекомбинантных молекул как больших, так и малых фрагментов-вставок. Если фрагменты все же необходимо фракционировать в сахарозном или солевом градиентах, следует использовать небольшие центрифужные пробирки (например, типа Beckman SW51) и соблюдать осторожность при осаждении этанолом (разд. 18.2). Если материала слишком мало для анализа фракций при помощи электрофореза, отберите их по эффективности включения в фagosые частицы.

Наконец, не прикасайтесь к вашим ценным препаратам ДНК до тех пор, пока не убедитесь, что все стадии методики работают с максимальной эффективностью. Особое внимание следует

обратить на стадию обработки фосфатазой (при ее наличии в плане эксперимента) (см. разд. 18.3). Используйте максимально эффективные упаковочные экстракты.

8. Амплификация

Рост рекомбинантного фага в первом приближении не зависит от нуклеотидной последовательности содержащейся в нем чужеродной ДНК, и если вектор и хозяин выбраны правильно (разд. 15 и 16), все участки генома будут представлены в фagosых частицах пропорционально. Если некоторые из рекомбинантов растут несколько быстрее или медленнее обычного, это может отразиться на размере бляшки, но огромное большинство рекомбинантных молекул даст начало бляшкам, даже самая малая из которых может быть зарегистрирована с помощью гибридизации.

Библиотеку, приготовленную для конкретной работы, можно упаковать, посеять на чашку, провести скрининг, а затем выбросить. Искомая последовательность либо будет обнаружена, либо в библиотеке ее не окажется. При необходимости можно упаковать большее количество ДНК и повторить скрининг. Если бы процедура клонирования была хорошо отработана, вероятно, следовало бы готовить только библиотеку однократного пользования для решения определенной задачи. Расщепленные донорную и векторную ДНК можно было бы заморозить и использовать по мере необходимости. С другой стороны, когда под руками имеются свежие и надежно работающие ингредиенты, наверно целесообразно приготовить библиотеку многократного использования.

Амплифицированные библиотеки сохраняют довольно высокий титр в течение нескольких лет [2], однако также не лишены недостатков. Они полезны не только как источник для получения многих генов в течение значительного времени, но и тогда, когда библиотека должна использоваться многократно, например при «прогулке по хромосоме» (разд. 12). Такие библиотеки удобны также для передачи другим исследователям. Главный недостаток амплификации состоит в том, что в ходе ее из-за дифференциального роста рекомбинантов содержание некоторых последовательностей в библиотеке может уменьшиться, и для успешного поиска интересующего нас клона понадобится скрининг большего числа негативных колоний (бляшек). Этот процесс, к сожалению, трудно оценить количественно, и о нем следует помнить, если искомый рекомбинант в библиотеке не обнаруживается. Непропорциональность числа клонов возрастает при конкурентном росте рекомбинантов в жидкой среде либо при большой плотности бляшек. В связи с этим амплификацию проводят, выращивая первичную библиотеку при

относительно низкой плотности бляшек на агаровых чашках, когда индивидуальные бляшки хорошо различимы. Кроме того, можно рекомендовать начинать амплификацию с более чем «полной» библиотеки. При этом также уменьшается вероятность одновременного заражения бактерии более чем одним рекомбинантным фагом, что может приводить к генетической рекомбинации между гомологичными повторяющимися элементами, присутствующими в разных вставках.

Амплификация с использованием дефектного по рекомбинации (Rec^-) хозяина позволяет обойти эту трудность и свести к минимуму рекомбинационную нестабильность внутри клонированного фрагмента ДНК (разд. 16.2). Подробные сведения по амплификации рекомбинантных производных векторов EMBL можно найти в работе [6].

Для уменьшения гетерогенности бляшек по размеру и, следовательно, дифференциальной амплификации следует использовать свежую культуру хозяина, на которой фаг был предварительно сорбирован (см. разд. 13.2), и кроме того, поддерживать чашки в строго горизонтальном положении до тех пор, пока не застынет верхний слой агара. После инкубации поверхность агара заливают слоем L-бульона или фагового буфера и оставляют более чем на час при комнатной температуре либо на ночь при 4°C . Суспензию фага собирают пипеткой в центрифужную пробирку, добавляют несколько капель хлороформа и центрифугируют при низкой скорости для удаления остатков бактерий. Фаг титруют и хранят при 4°C . Условия длительного хранения фага обсуждаются в работах [1, 2]. Амплифицированную библиотеку можно сконцентрировать с помощью равновесного центрифугирования в градиенте CsCl .

Амплифицировать такие библиотеки заново не следует, поскольку существует опасность избыточного роста субпопуляций относительно более жизнеспособных фагов.

9. Скрининг при помощи гибридизации

Если библиотека геномной ДНК получена, то гордый ее обладатель оказывается лицом к лицу с проблемой: как отыскать интересующую его последовательность среди 10^6 или более независимых клонов? Задачу эту, при отсутствии какого-либо зонда или системы поиска, можно сравнить с поисками иголки в стоге сена. В рамках данного раздела будем считать, что скрининг производится гибридизационными методами и имеются соответствующие ДНК- или РНК-зонды. Другие методы скрининга рассмотрены в разд. 10.

В большинстве случаев зонд представляет собой фрагмент ДНК, клонированный в плазмидном векторе и меченный путем транскрипции или другим способом. Следует заметить, что

ряд распространенных плазмидных векторов, например космиды и некоторые экспрессирующие векторы, содержат последовательности ДНК фага λ . Если те же последовательности присутствуют в плечах рекомбинантных молекул ДНК, то идентификация нужного рекомбинанта становится практически невозможной. В таких случаях фрагмент-зонд необходимо очистить при помощи электрофореза в агарозном геле до или после мечения [2, 13] (см. также разд. 12).

Гибридизацию проводят не на самих бляшках, а, не разрушая их, на фильтрах-репликах, снятых с этих бляшек [2, 14]. Используют нитроцеллюлозные или нейлоновые мембранные фильтры. Фаговые бляшки содержат не только амплифицированные частицы фага, но и значительные количества неупакованной, свободной фаговой ДНК. Эта ДНК, даже если она в некоторой степени повреждена, представляет собой неплохой субстрат для гибридизации. Чашку Петри или другой сосуд (использовались, в частности, пластиковые подносы) с агаром, на котором в слое верхней агарозы рассеяна некоторая часть библиотеки, накрывают стерильным фильтром соответствующей формы (круглым или прямоугольным), хорошо впитывающим влагу из агарозы. Фаговые частицы и свободная ДНК сорбируются на фильтре и, если поверхность агарозы не слишком влажна, при этом практически не размываются. Фильтр, снятый с агарозного слоя, несет на себе невидимую реплику картины расположения бляшек на его поверхности. Агарозу вместо агара для верхнего слоя используют потому, что в этом случае верхний слой не отстает от нижнего при снятии фильтра. Кроме того, при этом уменьшается неспецифическое связывание фильтром-репликой радиоактивного зонда.

С одной чашки можно получить несколько реплик. Для того чтобы денатурировать ДНК фага и закрепить ее на фильтре, реплики подвергают специальной обработке. Двухцепочечная ДНК не связывается с нитроцеллюлозой, а одноцепочечная, напротив, имеет к ней очень высокое сродство. При краткой обработке сильными растворами щелочи ДНК освобождается из фаговых частиц и денатурирует. При последующей обработке концентрированными буферными растворами pH становится ближе к нейтральному, однако ДНК остается в одноцепочечной форме и может быть необратимо фиксирована на фильтре запеканием при 80°C . Фильтр «прегибридизуют» в растворе, компоненты которого насыщают его неспецифические ДНК-связывающие центры, а затем гибридизуют с радиоактивными одноцепочечными ДНК- или РНК-зондами. При температуре и концентрации соли, благоприятствующих ренатурации гомологичных или частично гомологичных последовательностей (обсуждается в работе [2]), часть молекул зонда свяжется с тем участком фильтра, который несет родственную зонду последо-

вательность. Закрепившаяся таким образом на фильтре радиоактивность сохраняется в процессе промывки не содержащими зонда растворами, и ее можно обнаружить при помощи радиоавтографии [2, 14].

Затем уже нетрудно совместить «положительный сигнал» с соответствующей бляшкой (или участком) на чашке с агаром. Гибридизационный сигнал будет находиться в одной и той же точке на фильтре — реплике и его дубликате, благодаря этому его можно отличить от точек неспецифического связывания зонда, иногда по форме напоминающих бляшки.

На поверхности агаровой чашки диаметром 90 мм можно различить от 500 до 1000 отдельных бляшек. Геном, близкий по размеру к геному *E. coli* или дрожжей, может быть представлен «полностью» ($p=0,99$) в библиотеке из 10^3 — 10^4 независимых рекомбинантов. Для полного рассева такой библиотеки достаточно, следовательно, от 2 до 20 чашек, имеющих диаметр 90 мм. В случае удачи положительный сигнал на фильтре-реплике (репликах) может совпасть с бляшкой, удаленной от соседних на такое расстояние, которое позволяет выделить интересующий нас клон в чистом виде.

Скрининг с низкой плотностью бляшек возможен даже для генома дрозофилы ($3 \cdot 10^4$ рекомбинантов для $p=0,99$), однако он неэкономичен для геномов млекопитающих или растений ($3 \cdot 10^5$ — $3 \cdot 10^6$ рекомбинантов) как из-за высокой стоимости мембранных фильтров, так и из-за большого количества чашек. Поэтому скрининг больших библиотек обычно проводят при значительно большей плотности (10^4 и более бляшек на чашку диаметром 90 мм). При такой плотности бляшки почти сливаются, и найти и отобрать индивидуальную бляшку невозможно. В таких случаях из нужной области чашки вырезают столбик агара, фаг из него ресуспендируют в фаговом буфере и вновь рассевают в таком разведении, чтобы на поверхности чашки образовывалось 200—500 бляшек. С этих чашек вновь снимают фильтры-реплики, гибридизуют (для этого необходимо сохранить исходный зонд, см. разд. 18.10) и отбирают изолированные бляшки, совпадающие по положению с сигналами гибридизации.

Фаг может диффундировать вдоль поверхности агара, особенно после снятия с чашки фильтра-реплики. Поэтому на последней стадии, после скрининга как с высокой, так и с низкой плотностью, нужно очистить отобранную бляшку, рассеяв ее на отдельные колонии. Индивидуальную бляшку можно получить и при помощи посева штрихом [2]. Две случайно выбранные изолированные бляшки в конце штриха размножают для выделения из них ДНК.

Важно отметить, что при плотном рассеве (почти сливающиеся бляшки) условия благоприятствуют одновременному заражению некоторых бактерий (в участках перекрывания бля-

шек) более чем одним рекомбинантным фагом. Если не использовать Res^- -хозяина (разд. 16.2), это может привести к генетической рекомбинации между повторяющимися элементами, присутствующими в разных молекулах ДНК. Рекомбинация в свою очередь приводит к появлению жизнеспособных фагов, содержащих последовательности, принадлежащие разным участкам исходного генома. Особые трудности рекомбинация вызывает при клонировании донорных ДНК, несущих высокоповторяющиеся последовательности, такие, как Alu -элементы (встречающиеся примерно через каждые 10 т.п.н. в геноме человека и, следовательно, присутствующие в большом числе рекомбинантных фагов). Если скрининга с высокой плотностью в Res^+ -хозяине избежать нельзя, при анализе рекомбинантов следует помнить о возможности появления фагов с отличным от исходного расположением фрагментов генома, хотя большая часть положительно гибридизующихся фагов будет все же содержать интактные неперестроенные молекулы ДНК.

Кроме напоминающих по форме бляшки пятен могут встречаться и другие виды фоновой (неспецифической) гибридизации, не удаляющиеся при интенсивной промывке. К ним относятся, например, пятна или сплошной радиоактивный фон по всему фильтру, или же значительное включение метки во все бляшки (различимые только при скрининге с низкой плотностью). Если скрининг библиотеки ведется с помощью гомологичного зонда, положительный сигнал обычно обнаруживается без труда. При использовании же гетерологичных зондов либо сложных смесей радиоактивных кДНК или мРНК могут встретиться трудности. К сожалению, единственным надежным контролем для различения сигнала и фона (а значит, для решения вопроса о присутствии или отсутствии искомой последовательности в библиотеке) служит тот рекомбинантный фаг, который требуется получить. Если при скрининге возникают проблемы, то для того, чтобы проверить, нет ли ошибок на разных стадиях методики, необходимо поставить ряд контрольных экспериментов.

1. Контроль бляшек. Если имеются рекомбинантные фаги λ , гомологичные ДНК-зонду, их можно рассеять на отдельные бляшки при сравнительно низкой плотности на контрольной чашке. С этой чашки снимают реплику и используют ее для гибридизации. Такой контроль возможен, например, на всех (кроме начальной) стадиях «прогулки по хромосоме» (разд. 12). Можно также получить контрольную бляшку (макробляшку), перенося зубочисткой фаг на поверхность чашки, на которой рассеяна библиотека, сразу после того, как верхний слой агара застынет.

2. Контроль зонда. Фильтры-реплики гибридизуют с зондом, содержащим последовательность ДНК, заведомо присутствующую в библиотеке. Если этот зонд содержит последователь-

ность, повторяющуюся в геноме (например, клонированный ген рибосомной РНК), то достаточно будет провести скрининг небольшой части библиотеки. Подробная методика гибридизационного скрининга приведена в разделе 18.10.

10. Другие методы скрининга и селекции

Кроме наиболее часто используемого скрининга путем гибридизации с мечеными ДНК- или РНК-зондами существуют и другие. Один из них — это метод, разработанный Брайаном Сидом с сотр. [2]. Библиотеку геномной ДНК получают, как описано выше, но с использованием вектора, несущего две амбер-мутации в необходимых для развития фага генах. Библиотекой инфицируют *Rec⁺*-штамм *E. coli*, несущий фрагмент-зонд в молекуле плазмидной ДНК. Кроме зонда эта плазмида кодирует супрессор, мутантную тРНК, способную подавлять амбер-мутацию. Гомология между зондом и соответствующей рекомбинантной молекулой ДНК позволяет плазмиде рекомбинировать и включиться в геном фага. Несущие плазмиду фаговые частицы выделяют из лизата по их способности формировать бляшки на свободном от супрессора хозяине. Интегрированную плазмиду перед анализом и дальнейшей работой с клонированной ДНК необходимо удалить (путем эксцизионной рекомбинации). Наличие частичной (прерывистой) гомологии между зондом и донорной ДНК затрудняет решение этой задачи. Недостатком метода является также и то, что библиотеку необходимо выращивать в способном к рекомбинации (*Rec⁺*) хозяине (разд. 16.2). Разработан вектор EMBL3a (производное EMBL3), несущий две амбер-мутации, однако по неизвестным причинам эффективность селекции в нем [6] не достигает уровня, описанного Сидом [2] для вектора Харон 4А.

Скрининг может быть основан на экспрессии клонированных последовательностей ДНК. Используют как комплементацию дефектов бактерии-хозяина, так и иммунологический метод выявления полипептидов [1]. Изображенные на рис. 8 векторы замещения содержат сильные промоторы, с которых может происходить транскрипция клонированных ДНК, но не содержат элементов, обеспечивающих трансляцию мРНК. Такие методы больше подходят для генов прокариот, хотя некоторые успехи достигнуты и для генов низших эукариот.

11. Анализ рекомбинантных молекул ДНК

Выделив один или большее число рекомбинантных фагов по их биологическим или гибридизационным свойствам, необходимо получить характеристики их генома для того, например, чтобы установить точную структурную связь с зондом и друг с другом,

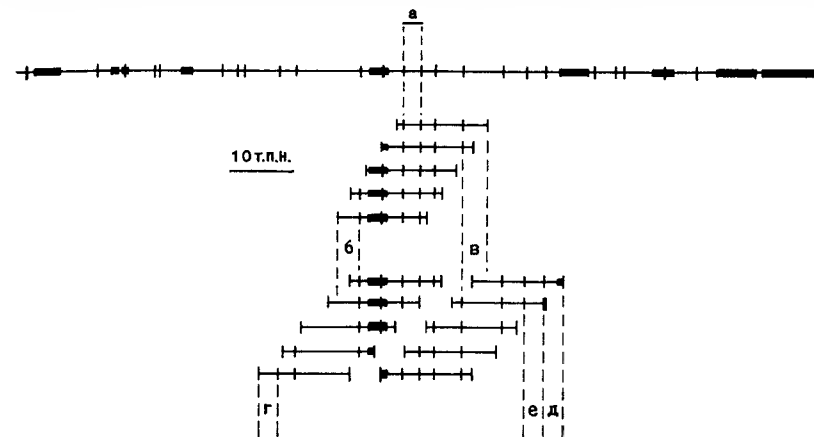


Рис. 5. «Прогулка по хромосоме». С клонированного *EcoRI*-фрагмента, не содержащего повторяющихся последовательностей (фрагмент а), начинают «прогулку» по содержащей этот фрагмент хромосоме в обоих направлениях. Вертикальными линиями обозначены сайты рестрикции *SaII*, имеющиеся как внутри фрагментов, так и на их концах (в составе полилинкера) и позволяющие точно отделять вставки от векторной ДНК. Зачерненные прямоугольники представляют собой относящиеся к различным семействам повторяющиеся последовательности. Другие последовательности тех же семейств находятся в отдаленных участках этой или других хромосом. С помощью зонда а идентифицируют набор перекрывающихся вставок в рекомбинантных молекулах ДНК фага. На рисунке показаны только сами вставки. Фрагменты б и в, лежащие на концах клонированной области, используют для выявления еще двух наборов перекрывающихся вставок. Процесс продолжают, используя фрагменты г и е. Фрагмент д непригоден для дальнейшего скрининга, так как содержит повторяющиеся последовательности и приводит к «разветвлению пути». Очень длинный участок повторяющейся ДНК (вблизи правого конца) можно преодолеть лишь с использованием космидной библиотеки.

а также разработать стратегию субклонирования, позволяющую провести дальнейший анализ и использование полученных клонов. Методы выделения большого количества λ -ДНК и ее анализа (рестрикционный анализ, гетеродуплексный анализ, агарозный гель-электрофорез, перенос по Саузерну и т. п.) описаны в работах [1, 2, 13, 15, 16, 17]. Мы остановимся только на нескольких моментах, имеющих отношение к анализу рекомбинантов.

1. Первый шаг в описании рекомбинантной молекулы ДНК — это чаще всего составление ее «рестриктной карты», указывающей положение участков узнавания рестриктазами, расщепляющими ДНК-вставку с небольшой частотой (обычно это ферменты, узнающие гексануклеотидную последовательность ДНК). Указанная задача решается проще, если имеется набор перекрывающихся клонов, так как именно области перекрытия между любой парой вставок дают информацию о взаимном распо-

ложении в них тех или иных фрагментов рестрикции (рис. 5). Использование ферментов, расщепляющих оставшийся в рекомбинантах участок полилинкера (например, *SalI* для вектора EMBL3, рис. 4), позволяет идентифицировать крайние фрагменты вставки. Эти фрагменты, в отличие от лежащих внутри вставки целиком, будут изменяться по размеру от клона к клону (вследствие «случайного» характера фрагментации генома). Если скрининг проходил при высокой плотности бляшек и в *Res⁺*-хозяине, важно иметь в виду, что возможны изменения во взаимном расположении участков ДНК внутри вставки (разд. 9).

2. Имеются олигонуклеотидные последовательности, комплементарные каждому из выступающих «липких концов» λ -ДНК. Их можно использовать для мечения любого из концов генома. Этот метод используется для быстрого получения рестриктных карт с помощью «лестницы» продуктов неполного расщепления [18], получаемой после их разделения электрофорезом. Лестницу можно читать с любого из концов генома. Такой анализ, очевидно, будет затруднен, если участки расщепления присутствуют и в плечах фага, а также если во вставке имеется несколько сближенных друг с другом участков расщепления. Векторы, *cos*-последовательности которых расположены вблизи тех участков, по которым производилось клонирование, позволяют получать большее разрешение.

3. В центральном фрагменте векторов EMBL имеется гомология с правым плечом векторной ДНК [6]. Это может привести к путанице в результатах при анализе гетеродуплексов между рекомбинантными молекулами и вектором (*Делиус*, личное сообщение). Поэтому, если необходим контроль для гетеродуплексного анализа, лучше использовать рекомбинантную, а не векторную ДНК.

12. «Прогулка по хромосоме»

Полученные описанными выше методами библиотеки идеально подходят для «прогулки по хромосоме» [19, 20] по двум причинам. Во-первых, они содержат перекрывающийся набор равно представленных фрагментов геномной ДНК, и поэтому теоретически любая точка хромосомы может быть пройдена в ходе «прогулки» от любой другой точки той же хромосомы. Во-вторых, сайты рестрикции, прилежащие к *Bam*HI-участкам вектора, в рекомбинантных молекулах сохранены. Например, к сайтам рестрикции *Bam*HI в векторе EMBL3 снаружи прилегают участки *SalI* (рис. 4). Таким образом, при помощи *SalI* можно точно отделить ДНК-вставку от плеч фага. Иногда дополнительные сайты *SalI* имеются и в самой вставке. Однако в любом случае можно идентифицировать специфический фраг-

мент (*SalI*—*SalI* или *SalI*—*X*, где *X* означает другой фермент, расщепляющий внутри вставки), который можно использовать в качестве зонда для поиска родственных клонов в библиотеке. Если используемые в качестве зонда фрагменты содержат последовательности конца или начала вставки, с них можно начать «прогулку» в обоих направлениях от области генома, содержащейся в исходном рекомбинанте (рис. 5). (Рестриктаза *Bam*HI непригодна для отделения плеч от вставки, так как только один из четырех гибридных сайтов узнавания *Bam*HI/*Sau*3A расщепляется этим ферментом.) Внутри полилинкера любого из показанных на рис. 8 векторов можно выбрать участки расщепления, позволяющие разделить ДНК вектора и вставки. Выбранные в качестве зонда фрагменты можно очистить от ДНК плеч λ и других нежелательных последовательностей, переклонировав их в плазмиде, не имеющей гомологии с λ -ДНК. Этот фрагмент также можно очистить элюцией или экстракцией из агарозного геля одним из методов, описанных в работах [2] или [13]. В тех случаях, когда неудачное расположение участков рестрикции не мешает отделению зонда в геле от нежелательных фрагментов, разумнее использовать второй метод, поскольку он занимает меньше времени.

Удельные активности, достаточные для скрининга библиотек фага λ (не более $2 \cdot 10^5$ — $1 \cdot 10^6$ расп./мин/мкг), можно получить путем достройки липких концов, оставшихся после расщепления рестриктазами, при помощи большого фрагмента ДНК-полимераза I *E. coli* (концевая метка). В каждый из концов можно ввести от 1 до 4 дезоксинуклеотидов, меченных 32 P. Если концы расщепленной рекомбинантной ДНК пометить до электрофореза, выделенный из геля фрагмент можно сразу использовать в качестве зонда. Это позволяет избежать трудностей, связанных с присутствием в агарозе загрязнений, мешающих ферментативным реакциям (например, достройке концов).

В большинстве случаев небольшой участок линкера, остающийся в зонде, гибридизуется с присутствующими в каждом рекомбинантном фаге гомологичными последовательностями очень слабо и не приводит к появлению неспецифического фона. Следует отметить, однако, что участок *Eco*RI в линкере векторов Харон 34 и 35 отстоит на 55 п.н. от участка клонирования (*Bam*HI) (см. рис. 8). Этого может быть достаточно для появления заметного и иногда мешающего фона.

Общий подход для «прогулки по хромосоме» состоит в следующем.

1. Проводят скрининг библиотеки ДНК-зондом с уникальной последовательностью (зонд *a*, рис. 5). Несколько бляшек, совпадающих по положению с сигналами гибридизации, собирают, очищают и содержащиеся в них фаговые частицы размножают в небольшом количестве. ДНК фагов выделяют и анализируют

с помощью расщепления рестриктазами и электрофореза в агарозе. Так как зондом служила уникальная последовательность, все эти ДНК должны содержать сходные последовательности в гомологичной зонду области. В этом можно убедиться с помощью переноса по Саузерну [12, 13], используя тот же зонд. Обычно это дает возможность идентифицировать перекрывающийся набор вставок и выявить в некоторых вставках фрагменты (например, фрагменты *б* и *в* на рис. 5), лежащие на границах клонированной области. Анализ упростится, если перед электрофорезом произвести отжиг ДНК плеч λ -вектора.

2. Так как фланкирующие вставку сайты рестрикции сохраняются в рекомбинантных молекулах, вставки *б* и *в* легко отделить от плеч фага. Фаговые частицы, содержащие эти фрагменты, размножают, выделяют из них ДНК, фрагменты *б* и *в* элюируют из геля и вводят в них радиоактивную метку. Используя эти фрагменты в качестве зондов для скрининга библиотеки, получают два новых набора перекрывающихся клонов, которые анализируют так же, как и первый набор. Концевые фрагменты *г* и *д* выделяют и используют как зонды для дальнейшей идентификации перекрывающихся клонов (рис. 5).

3. Эта простая, хотя и долгая процедура усложняется присутствием повторяющихся последовательностей ДНК, таких, как транспозоны бактерий, *coria*-подобные элементы или *Alu*-последовательности. В приведенной на рис. 5 схеме присутствует несколько повторяющихся последовательностей (обозначены зачерченными прямоугольниками). Вставка, из которой получен зонд *б*, по счастливой случайности перекрывает один из этих элементов. Зонд *д*, однако, содержит повторяющуюся ДНК и будет реагировать на вставки из участков генома, содержащих другие последовательности данного семейства. Этого можно избежать, взяв в качестве зонда фрагмент *е*, и таким образом «перепрыгнуть» через повторяющийся элемент в область ДНК с уникальной последовательностью. Такой подход, однако, имеет ограничения, так как с его помощью нельзя преодолеть длинные (>20 т. п. н.) участки повторяющейся ДНК (если только не использовать космидную библиотеку). К счастью, элементы повторяющейся ДНК такой длины встречаются нечасто. Как правило, повторяющиеся элементы можно распознать в рекомбинантных фагах с помощью гибридизации, а во фрагментах фаговой ДНК — при помощи переноса по Саузерну с использованием в качестве зонда тотальной меченой ДНК генома [19].

Иногда трудности, вызываемые присутствием повторяющихся последовательностей, можно преодолеть, используя гетерогенность этих последовательностей в различных природных изолятах *Drosophila melanogaster* [20]. «Прогулку», начатую на хромосомах одной линии мух и прерванную повторяющейся последовательностью, можно иногда продолжить на другой линии,

не имеющей в этом участке хромосомы повторяющейся ДНК, хотя сходные последовательности и имеются в других участках генома. Полиморфизм как в участках узнавания рестриктазами, так и в последовательностях-вставках может встретиться и в пределах одной библиотеки, если донорная ДНК была выделена не из инбредной линии.

В общем случае трудности «прогулки» в пределах данного участка хромосомы прямо пропорциональны частоте, с которой встречаются в нем повторяющиеся последовательности ДНК. Особенно утомительна «прогулка» по хромосомам высших растений и животных. В геноме человека, например, *Alu*-последовательности встречаются в среднем через каждые 10 т. п. н.

4. «Прогулка» по небольшому геному, такому, как *E. coli* ($<10^3$ бляшек для $p=0,99$), быстрее всего может быть осуществлена путем повторного скрининга одного и того же упорядоченного массива бляшек. Нет необходимости заново рассевать библиотеку для каждого нового скрининга. Упорядоченный массив из 1000 независимых бляшек можно создать на поверхности культуральной чашки размером 20·20 см путем осторожного переноса бляшек с помощью зубочисток. С такой эталонной чашки снимают несколько реплик. Одну из них используют для начального скрининга (зонд *а*). Бляшки, продемонстрировавшие положительные сигналы и хорошо отделенные от соседних бляшек, можно отобрать и размножить сразу, без дальнейшей очистки фага, особенно если одновременно с первым массивом создать другой, реплики с которого не снимаются. Неспецифические фоновые пятна и другие артефакты гибридизации в случае упорядоченного массива бляшек не вызывают особых затруднений, так что можно обойтись только одной репликой для каждого зонда (нитроцеллюлозные фильтры дороги). Вторую и третью реплики используют для скрининга зондами *б* и *в*. Каждую реплику можно использовать для скрининга несколько раз. Если чашку держать герметически закрытой и в перевернутом положении (для того чтобы конденсат не попадал на поверхность агара) при 4°C, фаг останется жизнеспособным в течение нескольких месяцев.

Не все бляшки, идентифицированные при помощи зондов *б* и *в*, необходимо анализировать на уровне ДНК, так как часть из них будет соответствовать бляшкам, уже идентифицированным зондом *а*, что дает возможность «путешествовать» преимущественно в нужном направлении. Кроме того, скрининг массива можно проводить одновременно с нескольких начальных точек.

Для сохранения массива в рабочем состоянии его необходимо либо перекалывать через каждые два месяца, используя эталонную чашку, либо изготовить трафарет для пересева бляшек с чашки на чашку. Хотя подготовка эталонной чашки —

весьма трудоемкая процедура, простота репликации такой чашки с помощью трафарета может компенсировать затраты труда по получению массива клонов для библиотеки генома, сходного по размеру с геномом дрожжей или даже дрозофилы. Этот метод позволяет картировать бактериальные геномы одновременно с нескольких участков. Многократная репликация и (или) длительное хранение библиотеки могут привести к размножению на бляшках устойчивых к фагу λ клеток *E. coli*, а также к появлению на чашках многочисленных цветных колоний других бактерий или грибов. В какой-то степени этого можно избежать, обрабатывая поверхность эталонной чашки перед хранением или использованием репликационного трафарета, парами хлороформа.

13. Бактериофаг λ

13.1. Некоторые сведения по биологии фага λ

Линейный геном фага λ упаковывается в икосаэдрическую головку, от которой отходит отросток, заканчивающийся хвостовой нитью — продуктом гена *J* (этот ген детерминирует круг бактерий-хозяев). Фаг λ , если его хранят при 4°C в фаговом буфере или L-бульоне, содержащем 1–10 мМ $MgSO_4$, и в хорошо отмытой от детергентов посуде, не теряет свою инфекционность в течение нескольких лет. Концом своей хвостовой нити частицы фага прикрепляются к рецепторным участкам внешней мембраны клеток. Эти рецепторы, кодирующиеся геном *lamB* *E. coli*, необходимы также для поглощения клеткой мальтозы, и их количество возрастает при выращивании клеток в среде, содержащей в качестве источника углерода мальтозу, но лишенной глюкозы для того, чтобы избежать катаболитной репрессии. Адсорбция не зависит от температуры и усиливается в присутствии ионов магния. Внедрение фаговой ДНК в клетку, зависящее от компонентов внутренней мембраны, напротив, протекает быстро при 37°C и медленно при низких температурах.

После того как геном λ проникает в клетку, он замыкается в кольцо при помощи липких концов и превращается в ковалентно замкнутую кольцевую молекулу. Эта молекула и становится субстратом как для репликации (рис. 7), так и для транскрипции. Фаг λ — умеренный фаг, который может вступать как в продуктивный (литический), так и в умеренный (лизогенный) циклы. В обоих случаях транскрипция, начинающаяся с двух «ранних» промоторов p_L и p_R (рис. 6), приводит к появлению функций, ответственных за репликацию ДНК, генетическую рекомбинацию, установлению лизогенного состояния и активацию транскрипции поздних генов. В ходе продуктивного (литического) цикла происходит переключение с ранней транс-

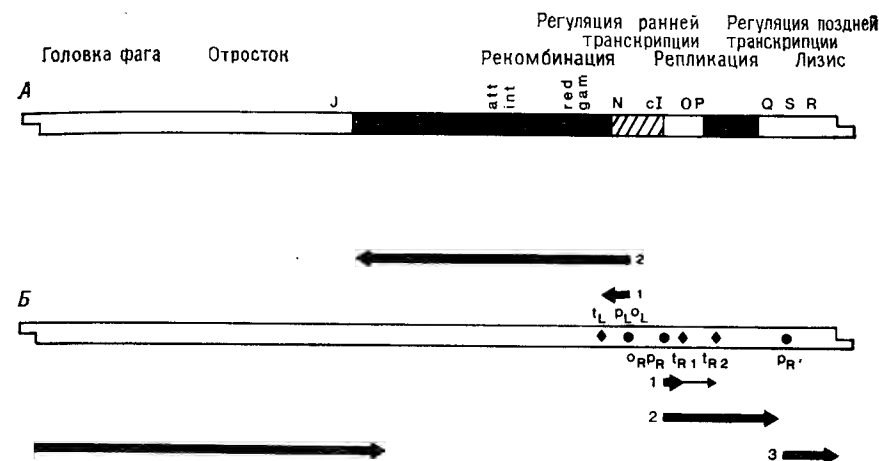


Рис. 6. А. Гены, кодирующие связанные между собой функции, расположены в одной области фагового генома. Зачерненные области не обязательны для размножения фага и в процессе конструирования описываемых в этой главе векторов (рис. 8) были удалены. Заштрихованный участок также необязателен, если отсутствует сайт терминирования t_R^2 (см. ниже). Ген *cI*, кодирующий λ -репрессор, у описанных здесь векторов делетирован, поэтому и векторы, и их рекомбинантные производные размножаются только по пути лизиса (рис. 1.7). Б. Транскрипция генома начинается с промоторов p_L и p_R . В начале инфекции инициированные на p_L и p_R транскрипты (1) терминируются соответственно в участках t_L и t_R^1 (некоторые из транскриптов p_R «проскакивают» t_R^1 и терминируются на t_R^2). Это приводит к появлению продукта гена *N*, в результате действия которого транскрипция перестает терминироваться на t_L и t_R^1 и продолжается в область прилежащих к ним генов (2). При этом включается синтез продукта гена *Q*, в присутствии которого на p_R' начинается транскрипция «поздних» генов (3). В результате этого считываются гены лизиса, *cos*-сайт (транскрибируется кольцевой геном, см. рис. 7), гены головки и отростка, вплоть до гена *J* хвостовой нити. Таким образом, ген *N* и его продукт в норме необходимы для активации поздних генов. Однако, если t_R^2 делетирован, к появлению продукта *Q* приводит независимая от гена *N* «утечка» транскрипции через t_R^1 . У большинства λ -векторов, включая описанные здесь, для увеличения максимального размера вставки произведена делеция (*nin* 5), захватывающая t_R^2 . В результате этой делеции фаг может расти и в отсутствие гена *N* и промотора p_L . Изображенные на рис. 8 векторы и их рекомбинантные производные имеют генотип N^+ и потому не зависят от «утечки» транскрипции. ● — главные промоторы; ◆ — главные сигналы терминирования.

крипции на позднюю, синтезируются белки вириона, реплицированные геномы упаковываются, клетка лизируется и из нее освобождается около 100 инфекционных фаговых частиц. В умеренном цикле, напротив, большая часть функций фага остается репрессированной, прямо или косвенно, молекулами λ -репрессора, связанного с определенными участками промоторов p_L и p_R . Если репрессия произошла до активации поздних генов, лизиса не происходит и может установиться лизогенное состояние. Для стабильной лизогении в отличие от abortивной необходима ин-

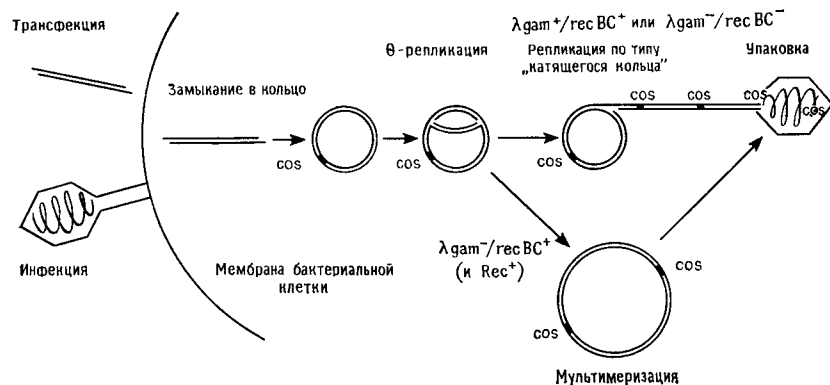


Рис. 7. Литический цикл развития бактериофага λ . ДНК фага можно ввести в бактериальную клетку либо в свободном виде (трансфекция), либо путем инфекции клетки фаговыми частицами. Внутри клетки ДНК при помощи своих липких концов замыкается в кольцо, и при действии ДНК-лигазы на теперь уже двухцепочечный *cos*-сайт образуется ковалентно замкнутая кольцевая молекула ДНК. В течение примерно 15 мин после инфекции репликация происходит двунаправленно (θ -репликация) и образуется некоторое число мономерных кольцевых копий ДНК фага. Переход к репликации кольцевых матриц по механизму «катящегося кольца» в клетках *E. coli recBC⁺* блокирован, если фаг не содержит функционального гена *gam*. Ген *gam* не обязателен для этого перехода, если нуклеаза *recBC* дефектна. Продуктом репликации по типу «катящегося кольца» являются линейные конкатенированные молекулы ДНК — обычный субстрат для упаковки *in vivo*. Мономерные кольца не способны упаковываться. В ходе процессинга конкатенированной ДНК ферменты упаковки узнают два *cos*-сайта, разделенные промежутком нужной длины (40—52 т. п. н.), и расщепляют по ним ДНК с образованием липких концов. Полученный в результате зрелый линейный геном фага, ограниченный липкими концами, и входит в состав инфекционной фаговой частицы. Фаг, не содержащий гена *gam*, можно (хотя и не так эффективно) размножить в клетках *recBC⁺*, если функционирует система общей генетической рекомбинации. Рекомбинация между мономерными кольцами приводит к появлению мультимерных кольцевых молекул, которые способны упаковываться.

теграция генома λ в специфический участок хромосомы хозяина. В этом случае геном фага (профаг) будет реплицироваться вместе с хромосомой *E. coli*. Все описанные в этой главе λ -векторы, однако, лишены гена репрессора и системы интеграции и поэтому неизбежно включаются в литический цикл.

При литическом пути развития активация поздних генов λ обычно связана с изменением основного механизма репликации ДНК (рис. 7). В течение первых 15 мин после инфекции двунаправленная репликация ДНК приводит к образованию мономерных кольцевых дочерних молекул (θ -тип репликации). Позднее основным продуктом репликации становятся линейные конкатенированные молекулы, образующиеся, видимо, по механизму «катящегося кольца». Конкатенированные геномы и являются субстратом для упаковки как *in vivo*, так и *in vitro*, при этом

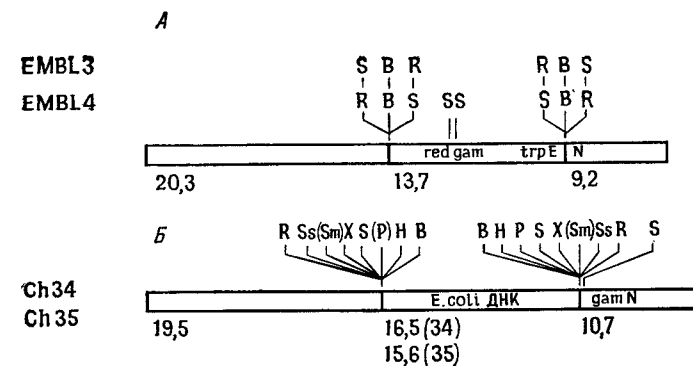


Рис. 8. Описанные в тексте векторы замещения. Указаны длины плеч и центральных фрагментов в т. п. н. А. Векторы EMBL3 и EMBL4 получены в несколько этапов из вектора 1059 [29]. Вектор 1059 не имел полилинкера, а его центральный фрагмент содержал последовательности плазмиды ColEI, поэтому при скрининге библиотек на основе 1059 плазмидными зондами фоновая гибридизация за счет последовательностей родительского фага значительно осложняла работу. Для устранения этих трудностей в центральный фрагмент EMBL3 и EMBL4 включены те же последовательности λ , что и в центральный фрагмент 1059 (некоторые из них дублированы в правом плече), но присоединенные вместо ColEI к гену *trpE E. coli K12*. Б. Векторы Харон 34 и 35 [8] различаются только центральным фрагментом. Их полилинкеры (60 п. н.) содержат несколько сайтов рестрикции, однако некоторые из этих сайтов содержатся и в плечах вектора. Донорные фрагменты, клонированные в уникальных сайтах расщепления *EcoRI*, *SstI*, *XbaI*, *HindIII* и *BamHI*, могут быть вырезаны из рекомбинантных молекул только по сайтам полилинкера. Клонирование возможно и по сайтам *SalI*, при этом используется сайт *SalI*, имеющийся в правом плече. Сайты полилинкера для *SmaI* и *PstI*, которые нельзя применять для клонирования, пригодны для вырезания вставки. Эти четыре вектора представляют собой результат многолетней генетической и биохимической работы с геном λ . Полная информация об их структуре содержится в оригинальных работах. Без такой информации невозможно сколько-нибудь точное предсказание рестриктных карт. Такие карты (в ряде случаев проверенные экспериментально) для многих часто используемых рестриктаз можно найти в работах [6] и [8]. Все векторы, представленные на рис. 8, имеют генотип *cl⁻* (Δ KN54) и делецию *nin5*, удаляющую участок терминирования *tr⁺* (рис. 6). Сокращенное обозначение участков рестрикции: B — *BamHI*, H — *HindIII*, P — *PstI*, S — *SalI*, Sm — *SmaI*, Ss — *SstI*, X — *XbaI*. EMBL3 и EMBL4 хранятся в Американской коллекции типовых культур.

находящиеся на нужном расстоянии друг от друга *cos*-последовательности расщепляются и получившиеся линейные (зрелые) геномы фага λ упаковываются. Переходу к механизму «катящегося кольца» мешает действие экзонуклеазы V, продукта генов *recB* и *recC E. coli*. Конкатенированная ДНК все же образуется в клетках *recBC⁺*, если фаг содержит функциональный ген *gam*. Продукт гена *gam*, появляющийся вскоре после инфекции, связывается с экзонуклеазой V и подавляет ее нуклеолитическую активность (но не всегда способность этого фермента участвовать в генетической рекомбинации).

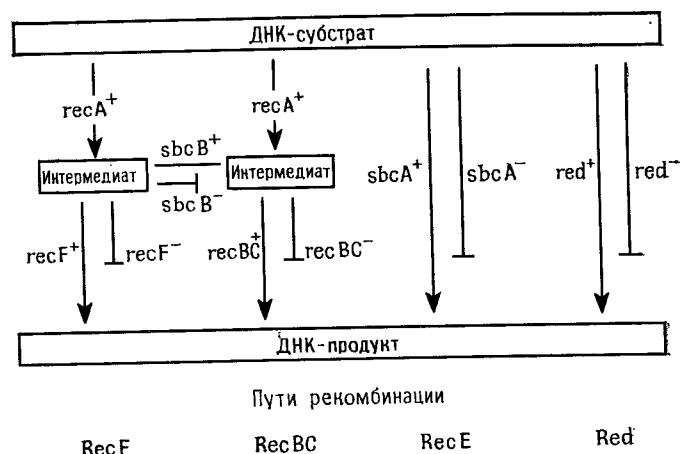


Рис. 9. Обсуждающиеся в тексте пути рекомбинации (модель и рисунок основаны на данных работы [21]). Путь рекомбинации RecBC является доминирующим (99%) у *E. coli* K12 дикого типа. Штаммы *recB*⁻, *recC*⁻ или *recB-recC*⁻ (*recBC*⁻) дефектны по этому пути. Появление в любом из этих штаммов мутации *sbcB*⁻, по-видимому, блокирует переход RecF-пути на путь RecBC, при этом продукт *recF* способен эффективно катализировать рекомбинацию (~50% от уровня дикого типа). У штаммов *recA*⁻, дефектных по обоим этим путям, рекомбинация выражена слабее всего (10^{-3} — 10^{-6} от уровня дикого типа). RecE — независимый рекомбинационный путь. Способность осуществлять рекомбинацию этого типа появляется в результате мутации *sbcA*⁻. С точки зрения биохимии и генетики путь RecE по многим признакам напоминает путь рекомбинации Red, характерный для фага λ дикого типа. Причина этого заключена в том, что ген *recE* содержится в дефектном λ -подобном профаге, присутствующем в хромосоме большинства штаммов *E. coli* K12. В норме ген *recE* (так же, как и гены *red* профагов λ) репрессирован. Мутация *sbcA*⁻, картируемая вблизи *recE*, каким-то образом активирует этот ген. Продуктами *recBC*⁺, *sbcB*⁺ и *recE*⁺ (= *sbcA*⁻) являются соответственно эндонуклеазы V, I и VIII.

Все описываемые здесь векторы имеют генотип *gam*⁺. Следует отметить, однако, что для увеличения максимальной длины вставки и для того, чтобы появилась возможность генетической селекции против нерекомбинантных фаговых частиц при высевах библиотеки (разд. 14), содержащейся в исходных векторах типа EMBL ген *gam* при получении рекомбинантных производных приходится приносить в жертву (рис. 8). Тем не менее *gam*⁻-рекомбинанты могут размножаться в *recBC*⁺-хозяине, если подвергаются в нем молекулярной рекомбинации с образованием ди- или мультимерных (и, следовательно, конкатенированных) молекул ДНК (рис. 7). Кодированные геном фага ферменты рекомбинации (Red) не могут участвовать в этом процессе, так как гены *red* обычно расположены в геноме λ рядом с геном *gam* (рис. 6), и также утрачиваются при удалении центрального

фрагмента. Следовательно, жизнеспособность рекомбинантов *red*⁻ *gam*⁻ определяется системой рекомбинации хозяина (Rec).

Если хозяин *recA*⁺ и одновременно *recBC*⁺, то рекомбинация, как ни странно, происходит через систему RecBC с участием экзонуклеазы V (разд. 16.2 и рис. 9). Подходящим субстратом для рекомбинации через систему RecBC будут только те молекулы фаговой ДНК, которые содержат одну или более копий октануклеотидной последовательности, обозначаемой Chi [1]. Фаг λ дикого типа не содержит последовательностей Chi (система Red не зависит от Chi). Для того чтобы рекомбинантные производные векторов EMBL можно было размножать в *recBC*⁺-хозяине, (таком, например, как лизоген P2, разд. 14), в ДНК плеч этих векторов введена Chi-последовательность. Некоторые векторы замещения, например Харон 4, Харон 4а и Харон 30 [1, 2, 4, 5], после удаления центрального фрагмента приобретают генотип *gam*⁻ *Chi*⁻, и, следовательно, рекомбинанты, содержащие в донорном фрагменте Chi-последовательность, будут значительно обгонять в росте не имеющие этой последовательности клоны. Следовательно, описанные векторы можно рекомендовать для конструирования представительных библиотек только в том случае, если эти библиотеки получают и амплифицируют на *recBC*⁻-хозяине. Рекомбинанты векторов Харон 34 и Харон 35 (рис. 8) имеют генотип *gam*⁺ (и *red*⁻) и не нуждаются в Chi-последовательности.

13.2. Факторы, влияющие на размер пятен

Для эффективной адсорбции фага λ на внешней мембране *E. coli* должен присутствовать кодируемый геном *lamB* рецепторный участок. Присутствие ионов магния облегчает адсорбцию. Погибшие клетки и даже их обломки также способны сорбировать фаг, вот почему следует избегать работы с культурами, находившимися продолжительное время в стационарной фазе и содержащими значительный процент мертвых клеток.

Для достижения максимума адсорбции следует взять отдельную колонию подходящих бактерий и инкубировать ее в L-бульоне, содержащем 0,4% мальтозы, до тех пор, пока титр клеток не достигнет примерно $2,5 \cdot 10^8$ (поглощение при 650 нм примерно 0,5). Бактерии концентрируют низкоскоростным центрифугированием, ресуспендируют в 1/2—1/10 объема 10 mM MgSO₄ и аэрируют встряхиванием при 37°C в течение 1 ч. Голодную культуру, содержащую Mg²⁺, можно хранить несколько дней при 4°C, при этом титр жизнеспособных клеток почти не падает (следует учесть, что клетки Rec⁻ не сохраняются).

Эффективная (>90%) адсорбция происходит при инкубации фага с клетками в течение 15 мин при комнатной температуре. При повышении температуры до 37°C ДНК быстро проникает

в клетку. Преадсорбция фага позволяет синхронизировать инфекцию и уменьшить разброс в размерах бляшек.

Суспензию фага обязательно следует развести, во-первых, для того, чтобы его можно было протитровать, а во-вторых, чтобы к бактериям можно было добавить заданное число фаговых частиц (даже единичная бляшка содержит 10^5 — 10^7 частиц фага). Концентрат фага можно разводить либо питательным бульоном, либо фаговым буфером (состав их приведен в разд. 18.1), хотя при длительном хранении бульон создает благоприятные условия для размножения посторонних микроорганизмов.

Для получения бляшек 0,1—0,2 мл суспензии бактерий ($\sim 10^9$ клеток/мл) с адсорбированными на них фаговыми частицами смешивают с 2—3 мл расплавленного 0,65%-ного питательного агара (или агарозы), имеющего температуру 50°C . Смесь медленно выливают на чашку с нижним слоем питательного агара (1,5%) и, осторожно покачивая чашку, распределяют смесь так, чтобы она при застывании образовала ровный верхний слой. При использовании культуральных чашек другого размера следует соответственно изменить объем смеси. Как верхний, так и нижний слои агара следует заливать на строго горизонтальном столе, в противном случае как размер бляшек, так и их количество будут различаться на разных участках чашки. Чашки инкубируют вверх дном, чтобы конденсат не стек на поверхность агара. Для проверки верхнего слоя на стерильность следует заливать контрольную чашку (без фага). Через 8—16 ч инкубации при 37°C на мутном фоне бактериального газона появляются прозрачные фаговые бляшки (негативные колонии) диаметром 0,1—2 мм. В качестве верхнего слоя агарозу применяют только в тех случаях, когда необходимо снятие фильтров-реплик (разд. 9). Заливать агарозу несколько сложнее, так как она застывает быстрее агара. Чашки, хранившиеся в холодильнике, следует перед заливкой верхнего слоя подогреть до комнатной температуры.

Не следует заливать верхний агар, если нижний слой содержит избыточную влагу, так как бляшки в этом случае могут расплзаться и даже смещаться, а слой верхнего агара при снятии реплик легче отстает от подложки. Во избежание этого чашки с нижним агаром следует подсушивать, выдерживая их в стерильных условиях со снятой крышкой до тех пор, пока на поверхности не появятся легкие морщины, либо заливать чашки за несколько дней до использования.

В общем случае любой фактор, увеличивающий время, необходимо для формирования сплошного газона бактерий, увеличивает и размер бляшек, так как бляшки перестают расти лишь после того, как образовался сплошной газон (т. е. по достижении клетками стационарной фазы). Бляшки будут больше, та-

ким образом, на чашках с менее богатой средой либо при добавлении меньшего числа бактерий. Кроме того, бляшки большего размера образуются во влажной среде, т. е. при росте на свежезалитых чашках, при невысокой концентрации нижнего агара или же в заполненном чашками влажном термостате (а не в термальной комнате).

Для ограничения размера бляшек, что удобно для скрининга библиотек при высокой плотности, подходит твердая и богатая среда (например, агар на L-бульоне) для нижнего слоя и агара на L-бульоне (0,65%) для верхнего слоя. С другой стороны, фаги *red-gam*⁻ (разд. 14) дают такие мелкие бляшки, в особенности на лизогенном по P2 хозяине, что может оказаться необходимым увеличить их размер. Не так уж редко бывает, что новичку вообще не удастся обнаружить мельчайшие бляшки фага *red-gam*⁻, если они росли при избытке клеток или на сухой богатой среде. В таких случаях используют более мягкую и бедную среду, например BBL-агар для нижнего слоя и верхний слой на основе BBL-триптиказы. Бляшки фага *red-gam*⁻ большого размера можно получить на медленно растущих штаммах *recBC*⁻, которые позволяют фагу реплицироваться по механизму «катящегося кольца», однако использование лизогенов P2 в этих случаях невозможно.

Следует запомнить, что:

1. Даже самые мелкие бляшки содержат достаточное для регистрации гибридизационными методами количество фаговой ДНК.
2. Хотя на газоне бактерий *recBC*⁻ образуются крупные бляшки, титр получающихся из них фаголизатов не всегда высок, поскольку при любом блокировании основных систем генетической рекомбинации падает и выход фага. Для получения фагов *red-gam*⁻ в высоком титре как на чашках, так и в жидкой культуре лучше использовать в качестве хозяина *Rec*⁺-варианты *E. coli recBC-sbcA*⁻ или *recBC-sbcB*⁻ (разд. 16.2).

14. Селекция против родительских фагов

Фаги *gam*⁺ не способны формировать бляшки на *E. coli*, лизогенной по фагу P2 (см. [1]). Этот, хотя и не вполне понятный, феномен можно обратить на пользу, вставив функциональный ген *gam* в центральный фрагмент вектора, который не содержал этого гена. Таким образом и сконструированы векторы EMBL3 и EMBL4 (разд. 15). При работе с ними нет необходимости перед лигированием плеч вектора с донорными фрагментами удалять (либо каким-то образом инактивировать) центральный фрагмент. Хотя среди продуктов лигирования будут присутствовать родительские (*gam*⁺) геномы, их рост будет эф-

эффективно подавляться при размножении библиотеки на штамме *E. coli* (P2). Формировать бляшки на таком газоне могут только рекомбинантные (*gam*⁻) фаговые частицы.

Чувствительность к мешающему влиянию P2 (фенотип *Sp*⁺, от англ. *sensitivity to P2 interference*) объясняется, по крайней мере отчасти, инактивацией нуклеазы *recBC* *E. coli* продуктом гена *gam* фага λ (разд. 13.1). Фаг P2 не способен лизогенизировать штаммы *recBC*⁻. Поэтому инфекция лизогена P2 *gam*⁺ (но не *gam*⁻) фагом λ приводит к прекращению репликации ДНК и синтеза белка. Фаг λ *gam*⁻ (и одновременно *Chi*⁺) способен расти на лизогенном по P2 хозяине, однако более крупные бляшки получаются в том случае, если фаг будет также и *red*⁻ (дефектен по рекомбинации). Говорят, что фаг *red*⁻ *gam*⁻ *Chi*⁺ имеет фенотип *Sp*⁺, так как он нечувствителен к действию профага P2. Какую роль в образовании фенотипа играет ген *red*, не известно, однако фенотип *Sp*⁻ широко используется для отбора *red*⁻ *gam*⁻-производных *Chi*⁺-фагов. Отбор *Sp*⁻-фенотипа лежит в основе селекции рекомбинантных производных *Chi*⁺-векторов замещения (например, EMBL3 на рис. 8), у которых центральный (замещаемый донорным) фрагмент содержит гены *red* и *gam* фага λ .

15. Выбор вектора замещения

Мы рассмотрим здесь только те векторы, которые могут использоваться для клонирования в сайтах *Bam*HI донорной ДНК, рестрицированной *Sau*3A. Такие векторы позволяют отделять клонированные последовательности от плеч (рис. 8). После расщепления *Eco*RI эти же векторы могут применяться, хотя и с меньшим эффектом, и для клонирования полученной механическим дроблением смеси случайных фрагментов ДНК после присоединения к ним *Eco*RI-линкеров. Более того, все приведенные на рис. 8 векторы можно использовать для клонирования фрагментов, образующихся после рестрикции донорной ДНК другими ферментами (для EMBL3, например, это *Eco*RI, *Eco*RI*, *Bam*HI, *Bgl*II, *Bcl*II, *Xho*II, *Sal*I, *Xho*I и один из типов фрагментов, образующихся при действии *Ava*I), хотя в большинстве случаев при этом нельзя получить представительной библиотеки.

Полилинкеры векторов EMBL3 и EMBL4 [6] ориентированы в противоположных направлениях, в остальном же векторы одинаковы. В обоих можно клонировать фрагменты длиной 9—22 т. п. н., и, так как их рекомбинантные производные, обладающие фенотипом *Sp*⁻ (разд. 14), можно отбирать генетически в лизогенах по P2, удалять центральный фрагмент в таких векторах нет необходимости. Простой биохимический метод инактивации центрального фрагмента EMBL3 (разд. 3.4) на-

столько эффективен, что до 98% способных к упаковке молекул при его применении представляют собой рекомбинанты. При использовании этого метода или при физическом удалении центрального фрагмента нет необходимости в применении P2-лизогенов, для которых характерен генотип *recA*⁺ и *recBC*⁺, и, следовательно, есть возможность селективно выделить *red*⁻ *gam*⁻-рекомбинанты в условиях *Rec*⁻ (разд. 16.2). В центральном фрагменте обоих векторов имеются два сайта для *Sal*I. Расщепление вектора EMBL4 одновременно рестриктазами *Bam*HI и *Sal*I, хотя и не позволяет ферментативно инактивировать центральный фрагмент (см. разд. 3.4), повышает разрешение при удалении этого фрагмента. Подробные рестриктные карты EMBL3 и EMBL4 можно найти в приложении к работе [1].

Векторы Харон 34 и Харон 35 [8] отличаются только центральными фрагментами и позволяют клонировать вставки длиной 9—20 т. п. н. Эти векторы содержат полилинкеры с большим числом участков рестрикции, чем EMBL3 и EMBL4, а их рекомбинанты имеют генотип *gam*⁺ и способны расти на любом *Rec*⁻-хозяине. При использовании этих векторов необходимо, однако, перед лигированием с донорными фрагментами отделить плечи векторов от центрального фрагмента. Центральный фрагмент вектора Харон 35 содержит два сайта для *Bam*HI, что упрощает выделение ДНК его плеч. Подробные карты этих векторов приведены в работе [8]. В правом плече векторов Харон 34 и Харон 35 имеется дополнительный сайт узнавания *Sal*I (рис. 8), однако данные векторы все-таки можно использовать для клонирования по *Sal*I, так как при расщеплении этим ферментом потери необходимой для развития фага ДНК не происходит.

Отдельно следует рассмотреть вопрос о выборе вектора для клонирования ДНК позвоночных и растений. В этих ДНК относительно редко встречается динуклеотид 5'-CG-3', лежащий в середине последовательности, узнаваемой *Sal*I (GTTCGAC). Поэтому сайты рестрикции *Sal*I в этих ДНК встречаются реже, чем следовало бы ожидать. Если такую ДНК клонировать в векторе, сайты *Bam*HI которого соседствуют с сайтами для *Sal*I (например, в векторе EMBL3), то, обрабатывая рекомбинантную молекулу ДНК рестриктазой *Sal*I, можно вырезать вставку, расщепленную на сравнительно небольшое число фрагментов (в случае удачи — в виде одного фрагмента). После этого нетрудно субклонировать вставку в сайте *Sal*I плазмидного вектора.

16. Выбор бактерии-хозяина

Обсуждающиеся в этом разделе штаммы *E. coli* и их генетические характеристики приведены в табл. 2.

Таблица 2. Бактерии, используемые в качестве хозяев

Фенотип ¹⁾	Отличительные черты генотипа ²⁾	Штамм ³⁾	Применение	Литература
rk ⁻	<i>sup⁰</i> <i>supE</i> <i>supE supF hsdR</i>	R594 C600 ED8654 (LE392, EQ82, BHB2600, BNN45) ⁴⁾ NM538 WA803	Непермисивен для фага λ ^{am} Для анализа и размножения фага λ То же, хороший акцептор для транс- фекции	[1] [1, 2] [1, 2]
rk ⁻ rk ⁻ mk ⁻	<i>supF hsdR</i> <i>supE hsdS</i>		Для анализа и размножения фага λ Фекции	[1, 6]
rk ⁻ Rec ⁻ rk ⁻ mk ⁻ Rec ⁻	<i>supE supF hsdR recA</i> <i>supE hsdS recBC</i>	NM531 546 GC508 CES201 ⁵⁾	То же, что ED8654, но Rec ⁻ RecBC ⁻ -хозяин для фага Spi ⁻	[1, 6] P. Kourilsky, лич- ное сообщение [см. 1]
rk ⁻ Rec ⁻ rk ⁻ Rec ⁻	<i>supE supF hsdR recA/p gam</i> <i>hsdR RecBC sbcB 15 recA</i>		RecA ⁻ -хозяин для фага Spi ⁻ RecA ⁻ -хозяин для фага Spi ⁻	C. Shurvington и F. W. Stahl (личное со- общение)
rk ⁻ RecF ⁺	<i>hsdR recBC sbcB 15</i>	CES200 ⁵⁾	RecF ⁺ -хозяин для фага Spi ⁻	C. Shurvington и F. W. Stahl (личное со- общение)
rk ⁻ RecE ⁺ rk ⁻ (P2) rk ⁻ (P2)	<i>hsdR recBC sbcA 23</i> <i>supE hsdR (P2)</i> <i>spF hsdR (P2 cox)</i>	NM519 Q359 NM539	RecE ⁺ -хозяин для фага Spi ⁻ Для селекции фага Spi ⁻ Для селекции фага Spi ⁻ (производный NM538)	[1] [1, 7] [1, 6]

¹⁾ Важнейшие фенотипические отличия от стандартного штамма *E. coli* K12.

²⁾ *supE* супрессировал большую часть *amber*-мутаций фага λ, кроме *Pam3*.

³⁾ Некоторые из этих штаммов можно получить в Американской коллекции типовых культур.

⁴⁾ Все эти штаммы — потомки ED8654.

⁵⁾ Штаммы, несущие *tn10*.

16.1. Система рестрикции — модификации хозяина

Все бактериальные штаммы, которые можно использовать в качестве хозяина для фага λ, представляют собой варианты *E. coli* K12. Эти бактерии в норме содержат рестриктазу (*EcoK*), расщепляющую ДНК в сайтах, узнаваемых этим ферментом. Чтобы защитить собственную ДНК, *E. coli* K12 продуцирует метилазу, которая модифицирует сайты узнавания и тем самым предохраняет их от расщепления. Немодифицированная ДНК фага, однако, будет рестрицироваться также, как и ДНК-вставки рекомбинантных молекул (последние будут подвергаться действию рестриктазы даже в том случае, если вектор был получен в модифицирующем штамме). Этого можно избежать, если в качестве хозяина для размножения рекомбинантных фагов использовать дефектные по рестрикции бактерии (*rk⁻*). Штамм *hsdR⁻* дефектен по рестрикции, но не по модификации (*rk⁻mk⁺*), а штамм *hsdS⁻* дефектен по обеим функциям (*rk⁻mk⁻*). Фенотип *rk⁻* легко распознать по неспособности таких бактерий различать модифицированные и немодифицированные производные фага λ. Немодифицированный фаг образует бляшки на *rk⁻*-хозяине примерно на три порядка эффективнее, чем на *rk⁺*.

16.2. Система генетической рекомбинации хозяина

E. coli K12 способна в той или иной степени осуществлять гомологичную рекомбинацию. Известно несколько путей рекомбинации (рис. 9). Те из них, которые зависят от продуктов *recBC⁺* и *recF⁺*, нуждаются также и в продукте гена *recA* дикого типа, в то время как путь рекомбинации *RecE* от него не зависит. Последовательность *Chi* стимулирует только рекомбинацию *RecBC⁺*-типа.

Рекомбинационные характеристики штаммов *E. coli* следует учитывать как при выборе хозяина для амплификации и скрининга библиотек (см. также разд. 8 и 9), так и при получении рекомбинантного фага в высоком титре для выделения ДНК. Было показано, например, что гомологичная рекомбинация между негомологично расположенными повторяющимися последовательностями фага λ приводит к появлению дупликаций и делеций, хотя этот процесс и ограничен в некоторой степени размерами получающихся в результате геномов. Особенно трудно размножать без делеций палиндромные последовательности. Хотя не так уже много данных о *Rec*-зависимой нестабильности рекомбинантных фагов опубликовано, такая нестабильность наблюдается нередко. Кроме того, может существовать *Rec*-независимая (и, вероятно, неизбежная) нестабильность. Размножение библиотек в клетках *Rec⁻* уменьшает гомологичную реком-

бинацию, однако выход фага при этом падает. Причиной этому может быть как понижение числа фаговых частиц, высвобождающихся при лизисе одной клетки (урожай фага), так и относительно высокое содержание мертвых клеток в Rec^- -культуре. Ведь фаговая частица, которая адсорбировалась на мертвой клетке, не размножается. Таким образом, при работе с Rec^- -хозяином потенциальный выигрыш в стабильности клонированных последовательностей оборачивается уменьшением выхода фага.

Для генетической селекции $\text{red}^- \text{gam}^- (\text{Sp}^i^-)$ -производных векторов EMBL на лизогенном по P2 хозяине необходимо использовать клетки Rec^+ . В поддержании лизогении по фагу P2 участвует продукт гена recBC (разд. 14), а образование конкатенированных ДНК фага невозможно без продуктов генов recA , recB и recC (разд. 13.1).

Рекомбинанты $\text{red}^- \text{gam}^+$, образующиеся из векторов Харон 34 и Харон 35, можно размножать в самых жестких Rec^- -условиях (recA^-). Если отказаться от генетической селекции, то рекомбинанты с генотипом $\text{red}^- \text{gam}^-$ также можно размножать в Rec^- -хозяине (в этом случае центральный фрагмент необходимо либо удалить, либо каким-то способом исключить возможность его лигирования с плечами вектора). Например, можно в качестве хозяина использовать штамм, несущий плазмиду, в состав которой входит ген gam фага λ (Г. Кроуз, личное сообщение). Эта плазида сконструирована так, что ген gam начинает экспрессироваться при заражении клетки фагом. В данном случае можно использовать хозяина $\text{recA}^- \text{recBC}^+$, так как его нуклеаза RecBC инактивирована и репликация будет протекать нормально (разд. 13.1). Такой способ, однако, неприменим в тех случаях, когда необходим скрининг библиотеки плазмидными зондами, содержащими участки, гомологичные несущей ген gam плазмиде. В качестве хозяина можно использовать и recBC^- -или $\text{recA}^- \text{recBC}^-$ -бактерии без несущей ген gam плазмиды. Оба этих штамма, однако, растут довольно плохо (особенно второй) и не обеспечивают высокий титр фага. Кроме того, для них характерна высокая частота реверсий и псевдореверсий к Rec^+ . Таким образом, при получении свежих колоний этого штамма (разд. 18.2) необходимо проверить их генотип. Если допустимы условия Rec^+ , а селекция по Sp^i необязательна, можно использовать хозяев $\text{recBC}^- \text{sbcA}^-$ (путь рекомбинации RecE) или $\text{recBC}^- \text{sbcB}^-$ (путь RecF). Оба этих штамма хорошо растут и допускают репликацию по типу «катящегося кольца», в них могут размножаться и gam^+ , и gam^- -фаги, однако больший урожай дают фаговые частицы gam^- . Если необходимо позаботиться о сохранении палиндромных последовательностей, стоит испытать в качестве хозяина штамм $\text{recBC}^- \text{sbcB}^-$ [22] (см. также работу Ваймана, Вольфа и Ботштейна, в печати). Из всего вышесказанного следует, что в целях максимальной безопасно-

сти следует использовать хозяина с генотипом $\text{recA}^- \text{recBC}^- \text{sbcB}^-$, однако при этом помнить, что выход фаговых частиц будет невысок.

17. Фаг λ или космида!

Главное достоинство космидного вектора [2, 23, 24] при конструировании геномных библиотек — это большая длина клонируемых фрагментов (~ 45 т.п.н.). Преимущество таких векторов состоит не в несколько меньшем числе рекомбинантов, образующих представительную библиотеку (табл. 1), а в том, что «прогулка по геному» предполагает меньшее число шагов. Кроме того, некоторые особенно длинные гены эукариот могут помещаться в одном фрагменте ДНК.

Еще одно преимущество космид состоит в том, что в них отсутствуют большие участки генома фага λ , которые могут создать трудности при картировании λ -рекомбинантов с помощью рестриктаз. Этот недостаток отчасти уравнивается тем фактом, что вставку длиной 45 т.п.н. картировать труднее, чем в 20 т.п.н. Еще не вполне ясно, насколько новые методы, такие, как анализ продуктов неполного расщепления (разд. 11), смогут упростить картирование фаговой ДНК, особенно если станут доступны λ -векторы, *липкие концы* и полилинкеры которых сближены.

Один из недостатков космидной системы состоит в том, что выход рекомбинантных молекул при ее использовании ниже, чем в случае λ -векторов. Особое значение это имеет в тех случаях, когда количество донорной ДНК ограничено. Не нужно забывать также, что для эффективного клонирования в космидах исходная ДНК должна обладать значительно большим молекулярным весом, чем для клонирования в фаге λ .

Второй и главный недостаток космид в том, что скрининг методом гибридизации ДНК менее эффективен для них (гибридизация колоний), чем для фагов (гибридизация бляшек). Отчасти это объясняется уменьшением числа копий плазмиды при увеличении ее размера. Трудность можно обойти, используя новую космидную систему (Литтл и Кросс, в печати). Такая система (число копий плазмиды в ней не зависит от размеров вставки) менее подвержена делециям, к которым обычно склонны рекомбинантные космиды. Альтернативой для гибридизационного скрининга служит недавно опубликованный метод [25] селекции космидных клонов по гомологичной рекомбинации с плазмидой, кодирующей устойчивость к дополнительному антибиотику.

В заключение отметим, что, хотя новые системы векторов разрабатываются, для их проверки и наладки требуется время.

18. Методические подробности

18.1. Среда и буферы

18.1.1. Среда на основе L-бульона

- | | | |
|--|---|-------|
| 1. L-бульон | Бакто-триптон (Difco) | 10 г |
| | Дрожжевой экстракт (Difco) | 5 г |
| | NaCl | 10 г |
| | Вода до | 1 л |
| Довести pH до 7,2 добавлением NaOH. Для культивирования фага λ и его производных внести 10 мМ $MgSO_4$. | | |
| 2. Агар на L-бульоне. К 1 л L-бульона добавить: | Бакто-агар (Difco) | 15 г |
| 3. Верхний слой на L-бульоне. К 1 л L-бульона добавить: | Бакто-агар (Difco) или агарозу для гель-электрофореза | 6,5 г |
| | $MgSO_4$ | 10 мМ |

18.1.2. Среда на основе BBL-триптиказы

- | | | |
|---|---|-------|
| 1. BBL-бульон | Триптиказа (Baltimore Biological Laboratories) | 10 г |
| | NaCl | 5 г |
| | Вода до pH 7,2 | 1 л |
| 2. Агар на BBL-бульоне. К 1 л BBL-бульона добавить: | Бакто-агар (Difco) | 10 г |
| 3. Верхний слой на BBL-бульоне. К 1 л BBL-бульона добавить: | Бакто-агар (Difco) или агарозу для гель-электрофореза | 6,5 г |
| | $MgSO_4$ | 10 мМ |

18.1.3. Буферы

- | | | |
|------------------------------------|------------------|---------|
| 1. Фаговый буфер | Трис-HCl pH 7,5 | 50 мМ |
| | NaCl | 100 мМ |
| | $MgSO_4$ | 10 мМ |
| | Желатина | 0,02% |
| 2. TE | Трис-HCl pH 8,0 | 10 мМ |
| | ЭДТА pH 8,0 | 1 мМ |
| 3. SSC | Хлористый натрий | 0,15 М |
| | Цитрат натрия | 0,015 М |
| 4. Лигазный буфер ($\times 10$). | Трис-HCl pH 7,5 | 0,675 М |
| | $MgCl_2$ | 0,1 М |
| | Дитиотрейтол | 0,15 М |
| | Спермидин | 10 мМ |
| | АТР | 10 мМ |

18.2. Общие замечания

Ниже приведены общие для многих методик правила.

1. Все используемые для работы буферы, растворы, ферменты, упаковочные экстракты, препараты ДНК, буферы для нанесения на гель и т. п. должны быть по возможности свежеприго-

товленными и не использоваться ни для чего, кроме конструирования библиотек. Необходимо очень тщательно поддерживать их чистоту. Много времени было потеряно в нескольких лабораториях на клонирование последовательностей плазмидной ДНК, случайно попавшей в препараты ферментов или другие реагенты. Следует отметить, что некоторые партии фенола содержат загрязнения или продукты окисления, способные вносить в ДНК одноцепочечные разрывы. Советы по приготовлению и использованию фенола можно найти в работах [1, 16].

2. Проверьте, соответствуют ли физические и биологические свойства векторов ожидаемым. Физическая структура вектора должна быть проверена при помощи рестриктового анализа, а биологические свойства — путем посева на подходящих индикаторных штаммах. Рост векторов EMBL, например, должен сильно тормозиться на *E. coli*, лизогенных по P2. Необходимо также проверить генотип бактериальных штаммов (*rec⁺/rec⁻*, *P2⁺/P2⁻*, *rk⁺/rk⁻*, *mk⁺/mk⁻*, см. разд. 16). Способность к рекомбинации можно оценить, облучая бактерии ультрафиолетом [2]. Клетки *Rec⁻* чувствительны к облучению, так как у них нарушена репарация УФ-индуцированных повреждений ДНК.

3. Для осаждения небольших количеств ДНК, хранения и добавления растворов ДНК, ферментов и т. п. используйте только стерильную пластиковую посуду и наконечники одноразового пользования. Малые количества ДНК могут необратимо сорбироваться на стекле.

4. При осаждении спиртом небольших количеств ДНК пересушенный осадок плохо заметен (поскольку его очень мало) и легко может быть потерян [26]. Потерять ДНК можно и в вакуум-экссикаторе, если резко сбросить вакуум. Поэтому перед сушкой пробирку следует закрыть парафином и проделать в нем несколько отверстий иглой. Для растворения высокомолекулярной ДНК требуется время.

5. При добавлении очень малых объемов следует учитывать погрешность микропипетки. В диапазоне 1—5 мкл ошибка добавления может быть значительной и изменяться от пипетки к пипетке. Поэтому для разбавления малых объемов фермента и других подобных операций следует пользоваться одной и той же микропипеткой. Это особенно важно при определении активности и проведении препаративного расщепления *Sau3A* и *MboI* (см. разд. 3.2). Для объема 1 мкл наиболее воспроизводимые результаты дает, видимо, использование стеклянных микропипеток. Будьте очень внимательны при отборе вязких растворов ДНК, так как для того, чтобы раствор заполнил наконечник микропипетки, требуется некоторое время. Для работы с такими растворами полезно отрезать кончик одноразового наконечника.

6. Стерильные растворы ДНК, не содержащие активных ферментов, можно хранить при 4°C длительное время. Замо-

раживать растворы более предпочтительно при -70°C , а не при -20°C [15]. Высокомолекулярную геномную ДНК замораживать нельзя.

7. На любой из многих следующих друг за другом стадий клонирования возможны ошибки, иногда по самым простым причинам. Если ошибку удалось заметить вовремя (для чего и ставятся контрольные эксперименты), то опыт еще можно «спасти» в том случае, когда имеется путь к отступлению. Для этого хорошо иметь запас исходного материала, а на промежуточных стадиях сохранять часть продуктов реакции. Значение контрольных экспериментов невозможно переоценить!

8. Исчерпывающий список реагентов, сред и буферов можно найти в [1]. Все среды перед использованием необходимо автоклавируют.

18.3. Проверка ферментов

Все ферменты необходимо проверить на присутствие нужной активности и отсутствие примесных нуклеазных активностей, которые могут помешать лигированию фрагментов ДНК. Большинство рестриктаз, узнающих гексануклеотидные последовательности, лучше всего проверять, полностью расщепляя небольшую молекулу плазмидной ДНК, имеющую один сайт для этого фермента (pBR322 имеет по одному сайту для *EcoRI*, *BamHI*, *SalI* и *HindIII*). Затем фермент инактивируют, ДНК осаждают этанолом, осадок промывают 70%-ным этанолом и растворяют в лигазном буфере (разд. 18.1) при концентрации ~ 100 мкг/мл. Половину препарата обрабатывают лигазой. Клетки *E. coli* трансформируют на устойчивость к ампициллину препаратами 1) нерестрицированной, 2) рестрицированной, 3) рестрицированной, а затем лигированной плазмиды (гл. 6). Фермент можно использовать для клонирования только тогда, когда высокая эффективность трансформации восстанавливается после обработки лигазой. Для большинства ферментов, узнающих тетра-нуклеотидные последовательности, трудно подобрать плазмиду с одним сайтом рестрикции, однако ДНК ϕX174 содержит лишь один такой сайт для *Sau3A* и *MboI*.

Эффективность лигирования можно проверить также, если на соседние дорожки агарозного геля нанести рестрицированную пробу и пробу, обработанную рестриктазой и лигазой. При успешном лигировании подвижность ДНК изменится (появятся кольцевая и мультимерные линейные формы).

Препараты фосфатазы значительно различаются по качеству. Фосфатазную активность можно проконтролировать, расщепив рестриктазой небольшую плазмиду и обработав ее фосфатазой, а затем лигазой. Чтобы узнать, не ингибирует ли фосфатаза реакцию лигирования, можно пролигировать не обработанный

фосфатазой препарат донорной ДНК (например, геномную ДНК после рестрикции *EcoRI*) с препаратом расщепленной и обработанной фосфатазой плазмиды (например, pBR322, рестрицированной *EcoRI*). После лигирования донорной ДНК с плазмидой, обработанной фосфатазой, выход устойчивых к ампициллину трансформантов должен резко возрасти.

Убедитесь, что количество проверенного фермента достаточно для конструирования библиотеки.

18.4. Выделение высокомолекулярной хромосомной ДНК из клеток эукариот

Этот метод представляет собой модификацию метода, описанного в работе [27].

1. ДНК с наибольшим молекулярным весом получают из свежих живых клеток или тканей. Если клетки нельзя обработать немедленно, следует быстро заморозить их в жидком азоте (N_2) и сохранить при -70°C . Перед замораживанием крупных кусков тканей измельчите их ножницами. Это ускоряет замораживание ткани и облегчает последующую обработку (стадия 2).

2. Охладите ступку и пестик жидким азотом. Налейте в ступку жидкий азот и добавьте препарат ткани (1–2 г). Не давая жидкому азоту испариться, разотрите препарат охлажденным пестиком в мелкий порошок.

3. Небольшой кисточкой (охлажденной в жидком азоте) перенесите порошок из ступки в охлажденный во льду гомогенизатор, содержащий 10 мл холодного раствора для гомогенизации (10 mM трис-HCl pH 7,4; 60 mM NaCl; 10 mM ЭДТА; 0,15 mM спермина; 0,15 mM спермидина; 0,5% (по объему) Тритона X100). Мы используем гомогенизатор фирмы Wheaton объемом 15 мл. Гомогенизируйте и профильтруйте гомогенат через плотную марлю в находящуюся на льду стерильную центрифужную пробирку. При необходимости обработайте таким же образом еще 1–2 г ткани. Промойте гомогенизатор 4 мл холодного раствора для гомогенизации и профильтруйте, смыв в ту же пробирку.

4. Как можно быстрее отцентрифугируйте гомогенат при 7000 об/мин и 4°C в охлажденном роторе в течение 7 мин.

5. Слейте надосадок и ресуспендируйте осевшие ядра в 10 мл холодного раствора для гомогенизации. Проще всего для этого слегка размешать осадок в пробирке пестиком гомогенизатора, перелить содержимое пробирки в гомогенизатор и гомогенизировать еще раз.

6. Повторите стадии 4 и 5.

7. Промытые ядра тщательно ресуспендируйте с помощью гомогенизатора в соответствующем объеме холодного раствора для гомогенизации и перенесите в пробирку с крышкой (напри-

мер, фирмы Falcon объемом 50 мл). Из концентрированного 10%-ного (вес/объем) раствора добавьте саркозил до 2% и перемешайте, осторожно переворачивая пробирку. В результате быстрого лизиса образуется вязкий раствор. Для достижения полного лизиса проинкубируйте пробирку 1 ч при 50°C.

8. Взвесьте лизат. Добавьте на 1 г лизата 1,25 г CsCl (55,55% по весу). Растворите CsCl, осторожно переворачивая пробирку.

9. Наполните этим раствором центрифужные пробирки и центрифугируйте до достижения равновесия при комнатной температуре (48 ч при 39 000 об/мин в роторе Beckman SW 41; 24 ч при 55 000 об/мин в роторе Beckman Type 65; 16 ч при 45 000 об/мин в роторе Beckman VTi 50).

10. Проткните стенку пробирки чуть выше дна (на дне — осадок РНК) толстой иглой для инъекций и соберите фракции по каплям. Содержащие ДНК фракции (0,5—1 мл), находящиеся вблизи центра пробирки, легко отличить по их высокой вязкости. Если ДНК слишком разбавлена и обнаружить ее по вязкости трудно, нанесите по 2—5 мкл из каждой фракции на поверхность 1%-ного агарозного геля, содержащего 1 мкг/мл бромида этидия. После того как капли подсохнут и ДНК диффундирует в агарозу, содержащие ее фракции можно обнаружить по их флуоресценции при облучении УФ-светом.

11. Эта стадия необязательна, однако позволяет получить более чистый и концентрированный раствор ДНК. Соберите содержащие ДНК фракции, разбавьте раствором CsCl (55,55 вес. %) и центрифугируйте снова в пробирке меньшего объема (например, для роторов Beckman SW 50.1 или Beckman VTi 65). Фракции соберите так же, как описано выше.

12. Соберите содержащие ДНК фракции и обработайте одним из следующих способов:

а) Проведите исчерпывающий диализ против ТЕ при 4°C. На этой стадии концентрация препарата может быть уже достаточно высокой. Концентрированные препараты храните в стерильных пробирках при 4°C. Если концентрация ДНК мала, сконцентрируйте ее, несколько раз осторожно экстрагируя равным объемом изо- или 2-бутанола [2]. Для удаления следов бутанола отдиализуйте концентрированный раствор против ТЕ при 4°C. Этот метод, вероятно, наиболее эффективен.

б) Разбавьте раствор втрое ТЕ, добавьте два объема этанола и очень осторожно смешайте, переворачивая пробирку. Нити осажденной ДНК слипаются и всплывают на поверхность раствора в виде комка. Зацепите этот комок концом пластиковой пипетки и перенесите в находящуюся на льду пробирку. Избыток жидкости удалите микропипеткой и растворите ДНК в нужном объеме ТЕ. Чистая ДНК, если она не

пересушена, растворяется быстро. Проведите исчерпывающий диализ против ТЕ при 4°C.

13. Приготовленная таким методом ДНК пригодна для конструирования библиотек в λ -векторах и расщепляется большинством рестриктаз. Обработку протеиназой К и(или) экстракцию фенолом можно при необходимости провести между стадиями 7 и 8 или после стадии 12. Экстракцию фенолом следует проводить осторожно. ДНК повреждается меньше всего, если наполовину заполненную пробирку медленно перекачивать по столу.

14. Определите концентрацию ДНК.

15. Проведите электрофорез в 0,3%-ной агарозе с необходимыми стандартами длины (например, интактная ДНК фага λ ~ 50 т. п. н., интактная ДНК фага T4 ~ 156 т. п. н.). Высокомолекулярная ДНК мигрирует сравнительно узкой полосой медленнее λ -ДНК.

18.5. Частичное расщепление *Sau3A*

1. 10 мкг геномной ДНК смешайте с 10 мкл 10х буфера для *Sau3A*. Объем доведите до 100 мкл стерильной дистиллированной водой.

2. Отберите 20 мкл в микроцентрифужную пробирку (пробирка 1) и по 10 мкл в остальные пробирки (2—9). Охладите во льду.

3. Коммерческие препараты *Sau3A* (и *MboI*) обычно содержат 5—10 ед. активности в 1 мкл. Непосредственно перед использованием разведите фермент рекомендуемым изготовителем раствором до концентрации около 1 ед./мкл. Добавьте 1 мкл в первую пробирку (0,5 ед./мкг/ДНК) и перемешайте. Отберите 10 мкл и смешайте с содержимым пробирки 2 (0,25 ед./мкг). Продолжайте разведение до пробирки 8, тщательно перемешивая. Пробирку 9 оставьте для контроля интактной ДНК.

4. Поставьте пробирки на водяную баню (37°C) на 1 ч.

5. Остановите реакцию, добавив ЭДТА до 20 мМ. Охладите пробирки во льду и проанализируйте ДНК горизонтальным электрофорезом в 0,3%-ном агарозном геле при 2 В/см в течение ночи (рис. 2). Низкое напряжение улучшает разрешение высокомолекулярных фрагментов ДНК [13]. 0,3%-ный гель заливайте в холодной комнате. Перед удалением гребенки наложите на гель буфер для электрофореза. Гель очень непрочен, обращайтесь с ним осторожно. В качестве стандартов длин подходят ДНК фага λ , расщепленная *EcoRI* или *HindIII* либо один из векторов замещения, расщепленный *BamHI*. Окрасьте гель этидиумбромидом (0,5 мкг/мл в течение 30 мин), промойте 30 мин и сфотографируйте, стараясь не переэкспонировать пленку.

6. Закройте фотографию выше и ниже нужного диапазона размеров (18—22 т. п. н.) и определите концентрацию фермента, дающую максимальную флуоресценцию в этой области. Концентрация фермента, равная половине определенной таким образом концентрации, дает максимальное число молекул в нужной области [2].

7. Проведите препаративную реакцию со 150—300 мкг ДНК. Все переменные (концентрацию ДНК и фермента, время, температуру) установите те же, что и в пробной реакции. Перед добавлением фермента прогрейте раствор ДНК при 37°C, так как для нагрева большого объема требуется некоторое время. Перемешивать реакционную смесь нужно мягко (без механического встряхивателя), но тщательно, чтобы избежать локальных флуктуаций концентрации ДНК и фермента. Реакционную смесь лучше разделить и обработать ферментом при условиях, отличающихся от оптимальных вдвое в большую и меньшую стороны. В противном случае фрагменты с аномальным распределением участков расщепления могут оказаться плохо представленными в библиотеке. Остановите реакцию добавлением ЭДТА до 20 мМ.

8. Проанализируйте аликвоту (аликвоты) ДНК электрофорезом в 0,3%-ном агарозном геле вместе со стандартами длины и проверьте правильность полученного распределения по размерам. Остальную ДНК храните при 4°C.

9. Препараты объедините, осторожно экстрагируйте дважды смесью фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1), добавьте NaCl до 0,3 М и два объема этанола. Смешайте, проинкубируйте 10 мин во льду и соберите ДНК центрифугированием. Промойте осадок дважды 70%-ным этанолом и растворите в 200—500 мкл ТЕ. Растворение ДНК ускорится, если смесь прогреть 10 мин при 65°C.

18.6. Фракционирование по размеру с помощью градиентного центрифугирования

Фракционирование в градиенте сахарозы описано в работе [2]. Преимущество фракционирования в градиенте хлористого натрия в том, что при этом нет необходимости удалять сахарозу.

1. Приготовьте градиент 5—25% (вес/объем) NaCl в пробирке объемом 12,5 мл (например, от ротора Beckman SW 41). Растворы NaCl должны содержать 3 мМ ЭДТА, pH 8,0. Градиент заливайте медленно (~1 мл/мин), с использованием стандартного прибора.

2. На поверхность градиента наложите ДНК в объеме 200 мкл. На одну пробирку наносите не более 150 мкг ДНК, так как большие количества ухудшают разрешение.

3. Центрифугируйте при 37 000 об/мин в роторе Beckman SW 41 или эквивалентном при комнатной температуре в течение 4,5 ч.

4. Соберите фракции по 0,25 мл в стерильные пробирки типа Эппендорф.

5. Отберите из каждой второй пробирки аликвоты по 25 мкл, разбавьте 3—4 объемами ТЕ и проанализируйте электрофорезом в 0,3%-ном агарозном геле с подходящими стандартами длины (рис. 3). Остаток храните при -20°C.

6. К фракциям, содержащим ДНК нужного размера, добавьте равный объем дистиллированной воды и 1 мл этанола. Хорошо смешайте и охладите в течение 10 мин в смеси сухого льда с этанолом либо в течение ночи при -20°C. Соберите осадок ДНК в микроцентрифуге в течение 15 мин. Удалите надосадок, осадок промойте дважды 70%-ным этанолом и высушите в вакуум-экситаторе. Растворите каждый из осадков в 20—50 мкл стерильного ТЕ.

7. Объедините нужные фракции и повторите стадии 1—6. Эта стадия необязательна.

8. Нанесите капли по 1—2 мкл из каждой фракции на поверхность 1%-ного агарозного геля, содержащего 1 мкг/мл этидиумбромид. Нанесите рядом серию разведений векторной (или другой) ДНК с известной концентрацией, перекрывающей ожидаемую концентрацию ДНК во фракциях. Дайте ДНК высохнуть и продиффундировать в агарозу. Оцените концентрацию ДНК во фракциях, сравнивая на глаз ее флуоресценцию с флуоресценцией стандартной векторной ДНК.

9. Обработайте концы фрагментов фосфатазой (разд. 3.2 и работа [6]). Эта стадия необязательна.

18.7. Проверка векторной ДНК

1. Распределение сайтов расщепления рестриктазами в векторной ДНК должно соответствовать ожидаемому.

2. Нерасщепленная векторная ДНК должна с высокой эффективностью упаковываться при помощи проверенных упаковочных экстрактов.

3. Полное расщепление векторной ДНК соответствующей рестриктазой (обычно 2—3-кратным избытком *Bam*HI) должно приводить к резкому падению эффективности упаковки (>10⁴ раз). (Партии фермента могут различаться.)

4. При лигировании расщепленного вектора «на себя» выход фага должен восстанавливаться, однако эффективность упаковки всегда будет ниже, чем для нерасщепленного вектора. Причиной малоэффективного лигирования может быть дефектная партия лигазы или лигазного буфера. С другой стороны, липкие концы, образующиеся при обработке рестриктазами,

либо липкие концы самого фага могут быть повреждены. Например, некоторые партии рестриктаз или лигаз (чаще всего рестриктаз) могут содержать примесные нуклеазные активности.

5. Некоторые векторы (например, серии EMBL) допускают генетическую селекцию против нерекомбинантных фагов (т. е. фагов с исходной последовательностью) в ходе размножения библиотеки (разд. 14 и 15). В этом случае удаление центрального фрагмента из ДНК расщепленного вектора необязательно. При использовании таких векторов перед реакцией лигирования нужно лишь инактивировать рестриктазу. Необходимо, однако, оценить «фон», возникающий при размножении расщепленного и лигированного вектора на хозяине, непермиссивном для родительского фага. Уровень фона всегда выше нуля и может изменяться в зависимости от партии вектора, рестриктазы или упаковочного экстракта. При расщеплении библиотеки для скрининга этот фон необходимо учитывать.

18.8. Расщепление векторной ДНК

1. Определите эмпирически условия полного расщепления векторной ДНК рестриктазой *Bam*HI. Расщепленную ДНК анализируйте электрофорезом в 0,5%-ном агарозном геле.

2. Расщепите 20—50 мкг векторной ДНК 2—3-кратным избытком *Bam*HI и проверьте результаты с помощью электрофореза аликвоты ДНК (0,5 мкг). Помните о необходимости диссоциировать ДНК плеч фага λ , прогревая образец перед электрофорезом 10 мин при 68°C. Определите долю нерасщепленных молекул ДНК при помощи упаковки *in vitro* и при необходимости обработайте ДНК рестриктазой повторно. Храните препарат вектора при -20°C.

3. Проведите одну из следующих процедур:

а) Для векторов типа EMBL при использовании генетической селекции против нерекомбинантных молекул вектора инактивируйте рестриктазу (стадия 4) и переходите к клонированию.

б) Инактивируйте центральный фрагмент EMBL с помощью рестриктазы [6]. Для этого добавьте в буфер необходимые для *Eco*RI компоненты и обработайте вектор трехкратным избытком *Eco*RI. Инактивируйте фермент (стадия 4), но осаждение для удаления линкерных фрагментов проведите изопропанолом вместо этанола (стадия 5). Переходите к клонированию.

в) Удалите центральный фрагмент. Перед этим инактивируйте фермент (стадия 4), добавьте к препарату векторной ДНК $MgCl_2$ до 10 мМ и проинкубируйте 1 ч при 42°C для отжига липких концов фага [2]. Проверьте полноту отжига

электрофорезом в агарозном геле. В качестве стандартов длины используйте интактную ДНК фага λ и аликвоту расщепленной векторной ДНК, прогретой для диссоциации липких концов 10 мин при 68°C. Отделите плечи фага от центрального фрагмента центрифугированием в градиенте сахарозы, NaCl или KI [2]. Проверьте чистоту ДНК плеч при помощи электрофореза в 0,5%-ном агарозном геле.

4. Инактивируйте рестриктазы осторожной экстракцией равным объемом фенола:хлороформа:изоамилового спирта (25:24:1), а затем хлороформа:изоамилового спирта (24:1). Добавьте NaCl до 0,3 М и осадите ДНК двумя объемами этанола. Соберите осадок в микроцентрифуге, промойте дважды 70%-ным этанолом, подсушите в вакуум-эксикаторе и растворите в подходящем объеме ТЕ в концентрации примерно 200—500 мкг/мл.

5. Приводимую ниже методику можно использовать для удаления очень коротких фрагментов ДНК (например, линкеров). Добавьте 0,1 объема 3 М ацетата натрия pH 6,0. Внесите 0,6 объема изопропанола, смешайте, проинкубируйте 15 мин на льду и осадите ДНК в микроцентрифуге при комнатной температуре в течение 5 мин [6]. Удалите надосадок и промойте осадок половинным объемом 40%-ного изопропанола в 0,3 М ацетате натрия pH 6,0. Подсушите осадок в вакуум-эксикаторе и растворите в нужном объеме ТЕ.

6. Определите точную концентрацию ДНК.

18.9. Определение оптимальных условий лигирования

1. Проведите лигирование аликвот донорной ДНК из фракций градиента, близких по длине к оптимальной длине вставки (например, от 15 до 25 т. п. н.) с постоянным количеством векторной ДНК. Упакуйте и оттитруйте (см. разд. 13.2) на подходящем штамме бактерий. Если условия частичного расщепления выбраны правильно, то максимум эффективности упаковки совпадает с фракциями нужного размера (~20 т. п. н. для векторов, описанных в разд. 15). Эффективность должна заметно снижаться для фракций, размер которых больше максимально допустимого для вектора. Следует тщательно проверить, что для конструирования библиотеки не выбраны фракции ДНК, длина молекул которых близка к предельно допустимой (см. разд. 3.2). Соберите подходящие фракции.

2. Проведите лигирование различных количеств отобранной донорной ДНК с постоянным количеством векторной ДНК (при концентрации 100—150 мкг/мл), упакуйте и оттитруйте. Для препаратов векторной ДНК, центральный фрагмент которых удален или же способность его к лигированию нарушена фер-

ментативно, максимальная эффективность должна наблюдаться тогда, когда отоженные плечи векторов и фрагменты донорной ДНК находятся примерно в эквивалентном соотношении. Так, если концентрация ДНК плеч вектора (~ 30 т. п. н.) составляет 100 мкг/мл, донорные фрагменты (средняя длина 20 т. п. н.) можно взять в концентрациях 15, 30, 60 и 120 мкг/мл (эквивалентному отношению соответствует концентрация 67 мкг/мл).

Если центральный фрагмент не удалялся (т. е. если применяется генетическая селекция против нерекомбинантных фагов), плечи фага при лигировании должны присутствовать в молярном избытке, так как эффективность лигирования донорной ДНК будет расти асимптотически с увеличением отношения концентраций ДНК плеч и вставок [6]. Компромиссные условия реакции выбирают таким образом, чтобы эффективность была достаточной при не слишком большом расходе реагентов для лигирования.

Определенные таким образом условия реакции подходят для большинства случаев.

3. На всех стадиях проверки следует тщательно следить, чтобы основные параметры, такие, как концентрация лигазы, буферы, упаковочные экстракты, бактериальные штаммы, не менялись; липкие концы векторной ДНК необходимо отжигать, инкубируя эту ДНК в течение часа при 42°C в присутствии 10 mM MgCl_2 . Необходимо точно придерживаться инструкции по работе с упаковочными экстрактами. Для титрования фага следует выбирать культуральную среду, на которой образуются крупные, хорошо видимые бляшки (разд. 13.2). Если библиотеку предполагается размножить не на том штамме, на котором определялись оптимальные условия лигирования, предназначенный для размножения библиотеки штамм следует проверить на эффективность образования бляшек.

4. Для контроля поставьте реакции упаковки без добавления какой-либо ДНК и с добавлением расщепленной и лигированной «на себя» векторной ДНК. Концентрация ДНК должна быть той же, что и в пробной реакции. При проведении препаративной упаковки следует учитывать фон, появляющийся за счет недорасщепления вектора, загрязнения ДНК плеч вектора центральным фрагментом, а также вследствие ошибок системы Spi -селекции (разд. 14) либо присутствия фаговой ДНК в упаковочном экстракте. Вклад в фоновую гибридизацию некоторых из этих факторов можно оценить прямо, например проводя скрининг части библиотеки радиоактивным зондом, гомологичным участку центрального фрагмента вектора.

5. Сохраняйте пробные реакции до окончания конструирования библиотеки.

Каждую новую партию упаковочного экстракта следует проверить на эффективность, с которой происходит упаковка

«стандартной» λ -ДНК, например, используемого вектора. Для пробных экспериментов, однако, не обязательно использовать экстракты с наивысшей эффективностью.

18.10. Подробная методика гибридизационного скрининга

1. Для скрининга как с высокой, так и с низкой плотностью рассейте фаг и убедитесь, что бляшки невелики и гомогенны по размеру (разд. 13.2). Не используйте недавно залитые (влажные) чашки; готовьте верхний слой на агарозе, а не агаре. Инкубируйте чашки в перевернутом положении. После появления бляшек перенесите чашки в холодильник (4°C) не менее чем на час. Это позволяет избежать отделения верхнего слоя при снятии с чашки фильтра. Фильтры-реплики можно получать даже с чашек, хранившихся в течение нескольких недель.

2. Пронумеруйте нитроцеллюлозные фильтры карандашом, наложите их на чашки и дайте полностью пропитаться влагой. Нитроцеллюлоза может быть электростатически заряжена и притягиваться к поверхности агара. Чтобы фильтр неожиданно не прилип к чашке в неправильном положении, придерживайте его руками (в перчатках). При наложении на чашку слегка согните фильтр так, чтобы сгиб коснулся середины чашки. Осторожно опускайте края фильтра, выжимая из под него воздух и не допуская образования морщин и пузырей под фильтром. При работе с очень большими фильтрами полезно разгладить фильтр рукой (в перчатке). Если вы предполагаете, что между снятием реплики и отбором положительно гибридизующихся бляшек пройдет больше двух недель, используйте стерильные (автоклавированные) фильтры.

3. На край чашки и фильтра нанесите три асимметричные отметки, протыкая одновременно фильтр и агар до дна чашки иглой для подкожных инъекций. Вторым фильтром (дубликат) можно маркировать в тех же точках, рассматривая на просвет. Отметки в агаре будут видны сквозь фильтр-дубликат.

4. После того как фильтр пропитается (~ 30 с для первого фильтра и 1 мин для дубликата), осторожно, начиная с края, снимите фильтр с агара пинцетом с тупыми концами. Более длительная выдержка результатов не ухудшает. Если верхний агар прилип к фильтру и поднимается вместе с ним, опустите фильтр на место и начните с другой точки.

5. Положите фильтры обращенной к агару стороной вверх на лист фильтровальной бумаги Whatman (3MM или другой), пропитанный денатурирующим раствором (0,5 M NaOH; 1,5 M NaCl). Через 5 мин перенесите фильтры на другой лист Whatman пропитанный на этот раз нейтрализующим раствором

(0,5 М трис-HCl pH 8,0; 1,5 М NaCl). Через 5 мин снимите их и погрузите на 5 мин в нейтрализующий раствор. Промойте фильтры раствором $2\times\text{SSC}$, положите на бумагу 3ММ и дайте просохнуть. Поместите фильтры между листами бумаги 3ММ и запеките при 80°C в течение 2 ч, желательно в вакууме.

При обработке большого количества фильтров бывает трудно выдержать указанные выше интервалы. Критична лишь стадия денатурации. Если фильтры слишком долго находились в растворе NaOH, они становятся весьма ломкими. То же происходит при слишком длительном запекании.

6. Прогибридизуйте фильтры с имеющимся зондом и отмойте в выбранных условиях (см. работу [2]). Удалите избыток жидкости с фильтров, поместив их на лист бумаги Whatman 3ММ. Если может понадобиться повторная промывка фильтров, их не следует пересушивать.

7. Поместите влажные фильтры между слоями тонкой поливинилхлоридной пленки (типа Saran Wrap). Благодаря этому фильтры не будут смещаться при радиоавтографии и их не нужно специально закреплять. Кроме того, если фон будет слишком велик, фильтры можно легко снять для дополнительной отмывки. Наложите на фильтры рентгеновскую пленку для радиоавтографии [2, 28]. Для ориентации пленки относительно фильтров между слоями поливинилхлоридной пленки поместите небольшие клейкие ярлычки, подписанные радиоактивными чернилами.

8. Отметьте на рентгеновской пленке положение асимметричных меток. Совместите автографы фильтров-дубликатов и отметьте положения пятен, подходящих по размеру к бляшкам и совпадающих по положению на обеих репликах. С исходной чашки отберите либо соответствующую бляшку, либо столбик агара из нужной области (используйте широкий конец стерильной пастеровской пипетки). Поместите бляшку или столбик в 1 мл фагового буфера, добавьте 1 каплю хлороформа и проинкубируйте для диффузии фага 1 ч при комнатной температуре или ночь при 4°C. При использовании чашек Петри диаметром 90 мм совместить фильтр с чашкой довольно легко. При использовании чашек большего размера фильтр может быть несколько растянут или деформирован при обработках. Поэтому во избежание ошибок размер отбираемого столбика агара должен в этих случаях быть достаточно большим. Для фильтров большого размера число ориентационных меток желательно увеличить.

9. С одной чашки можно последовательно снять более пяти реплик. Если фильтры перестают увлажняться, чашки следует выдержать несколько дней при 4°C для появления в них влаги. Помехи за счет неспецифической гибридизации обычно выражены сильнее для первой реплики.

10. Если чашки предполагается хранить длительное время либо если они содержат массив, предназначенный для пересева с помощью трафарета (разд. 12), необходимо предотвратить размножение на этих чашках устойчивых к фагу λ *E. coli* и других бактерий. Этого можно отчасти достигнуть, обработав поверхность агара парами хлороформа. Положите на стол лист алюминиевой фольги. Кусок бумаги Whatman 3ММ, совпадающий по форме с чашкой, но несколько меньший по размеру, положите на фольгу и пропитайте хлороформом. Наложите на него перевернутую чашку и проинкубируйте 10–15 мин. Хлороформ не должен попадать на пластиковые чашки, так как пластик легко в нем растворяется, после чего крышка может приклеиться к чашке. Иногда на поверхности агара могут появиться капельки конденсированного хлороформа, которые при переворачивании чашки растекаются. Это, по-видимому, не приводит к сколько-нибудь заметному размыванию бляшек. Полезно также добавить к агару противогрибковые препараты, например фунгизон.

11. Для перенесения бляшек с чашки на чашку, а также для репликации библиотеки при помощи трафарета залейте слой верхней агарозы, содержащий 10 мМ MgCl_2 и 0,1 мл клеток на чашку диаметром 90 мм. Остудите агарозу в течение нескольких минут при комнатной температуре или при 4°C. Достаточное количество фаговых частиц будет перенесено при легком касании поверхности чашки зубочисткой или трафаретом. Переверните чашку и проинкубируйте ночь при 37°C.

12. Перед тем как использовать ДНК-зонд для следующего скрининга, его необходимо заново денатурировать. Если гибридизацию проводят в 50%-ном формамиде, прогрейте зонд 10 мин при 80°C. В остальных случаях прокипятите зонд в течение 5 мин. Перед использованием охладите во льду.

Благодарности

Мы благодарим наших коллег из Эдинбурга, Глазго, Лондона и Гейдельберга за советы по различным аспектам экспериментальных методик. Благодарим также Джона Люнека, Эндрю Мак-Кейба, Кея Мюррея, Шона Скэхилла и Барбару Скин за замечания по различным разделам рукописи в ходе неоднократных ее доработок. Хотим отметить терпение, проявленное Линдой Кер, Мэй Вилд и Бетти Мак-Крэди при подготовке рукописи.

Литература

1. Hendrix R. W., Roberts J. W., Stahl F., Weisberg R. A. (eds.). *Lambda II*, published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1983.
2. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. *Molecular Cloning. A Laboratory*

- Manual, published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. [Имеется русский перевод: Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984.]
3. Sanger F., Coulson A. R., Hong G.-F., Hill D. F., Petersen G. B. J. Mol. Biol., 162, 301 (1982).
 4. Williams B. G., Blattner F. R. In: Genetic Engineering, Setlow J. K. and Hollaender A. (eds.), Plenum Press, New York, Vol. 2, p. 201 (1980).
 5. Brammar W. J. In: Genetic Engineering, Williamson R. (ed.), Academic Press, London, Vol. 3, p. 53 (1982).
 6. Frischhauf A.-M., Lehrach H., Poustka A., Murray N. J. Mol. Biol., 170, 827 (1983).
 7. Karn J., Brenner S., Barnett L. In: Methods in Enzymology, Wu R., Grossman L. and Moldave K. (eds.), Academic Press, New York and London, Vol. 101, p. 3 (1983).
 8. Loenen W. A. M., Blattner F. R. Gene, 26, 171 (1983).
 9. Maniatis T., Hardison R. C., Lacy E., Lauer J., O'Connell C., Quon D., Sim D. K., Efstratiadis A. Cell, 15, 687 (1978).
 10. Fuchs R., Blakesley R. In: Methods in Enzymology, Wu R., Grossman L. and Moldave K. (eds.), Academic Press, New York and London, Vol. 3, p. 3 (1983).
 11. Enquist L., Sternberg N. In: Methods in Enzymology, Wu R. (ed.), Academic Press, New York and London, Vol. 68, p. 281 (1979).
 12. Clarke L., Carbon J. Cell, 9, 91 (1976).
 13. Sealey P. G., Southern E. In: Gel Electrophoresis of Nucleic Acids — A Practical Approach, Rickwood D., Hames B. D. (eds.), IRL Press, Oxford, p. 39, 1982.
 14. Benton W. D., Davis R. W. Science, 196, 180 (1977).
 15. Davis R. W., Botstein D., Roth J. R. Advanced Bacterial Genetics, published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1980.
 16. Schleif R. F., Wensink P. C. Practical Methods in Molecular Biology, published by Springer-Verlag Inc., New York, 1981.
 17. Rodrigues R. L., Tait R. C. Recombinant DNA Techniques, an Introduction, published by Addison-Wesley, Reading, Massachusetts, 1983.
 18. Rackwitz H.-R., Zehetner G., Frischauf A.-M., Lehrach H. Gene, 30, 195 (1984).
 19. Hadfield C. In: Focus, Betesda Research Laboratories Inc., Gaithersburg, Maryland, 20877, Vol. 5, No. 4, 1983.
 20. Bender W., Spierer P., Hogness D. S. J. Mol. Biol., 168, 17 (1983).
 21. Horii Z., Clark A. J. J. Mol. Biol., 80, 327 (1973).
 22. Leach D. R. F., Stahl F. W. Nature, 305, 448 (1983).
 23. Hohn B. In: Methods in Enzymology, Wu R. (ed.), Academic Press, New York and London, Vol. 68, p. 299 (1979).
 24. Collins J. In: Methods in Enzymology, Wu R. (ed.), Academic Press, New York and London, Vol. 68, p. 309 (1979).
 25. Poustka A., Rackwitz H.-R., Frischauf A.-M., Lehrach H. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4129 (1984).
 26. Shapiro D. J. Anal. Biochem., 110, 229 (1981).
 27. Bingham P. M., Levis R., Rubin G. M. Cell, 25, 693 (1981).
 28. Laskey R. A. In: Methods in Enzymology, Grossman L. and Moldave K. (eds.), Academic Press, New York and London, Vol. 65, p. 363 (1980).
 29. Karn J., Brenner S., Barnett L., Cesareni G. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5172 (1980).

КОНСТРУИРОВАНИЕ И СКРИНИНГ БИБЛИОТЕК кДНК В ВЕКТОРАХ λ gt10 И λ gt11

Тхань В. Кхунь, Ричард А. Янг, Рональд В. Дэвис

1. Введение — λ -векторы для клонирования кДНК

Изучение структуры и экспрессии генов эукариот включает в качестве обязательного промежуточного этапа клонирование этих генов. Во многих случаях клоны эукариотических генов получают, используя ДНК-копии матричной РНК, кодируемой этими генами (клоны кДНК). Стратегия такого подхода состоит в следующем: из соответствующей ткани или линии клеток экстрагируют полиаденилированную РНК и на ее основе конструируют библиотеку кДНК, представляющую данную популяцию мРНК. Нужный клон кДНК идентифицируют путем скрининга библиотеки зондами на основе синтетических олигонуклеотидов, кДНК (синтезированных на дифференциально экспрессирующихся мРНК), либо зондами на основе антител. Частота, с которой клоны кДНК, представляющие данную мРНК, встречаются в библиотеке, обычно пропорциональна содержанию этой мРНК в клетке. Для выделения кДНК-клонов редких мРНК необходимы очень большие библиотеки кДНК, представляющие многокомпонентные популяции *polyA*⁺-РНК. В этой главе подробно описана несложная процедура получения библиотек кДНК, содержащих 10^5 — 10^7 рекомбинантов. Двухцепочечные кДНК, приготовленные по описанному здесь методу, лигируются с одним из λ -векторов. Использование вместо плазмидных векторов векторов на основе фага позволяет применять для введения чужеродных ДНК в клетки *E. coli* такой высокоэффективный и воспроизводимый метод, как метод упаковки λ -ДНК *in vitro*. Высокая эффективность клонирования кДНК в λ -векторах необходима при поиске клонов кДНК, соответствующих редким мРНК, а также в тех случаях, когда исходная мРНК доступна в ограниченных количествах.

В этой главе описано применение двух λ -векторов, пригодных для клонирования кДНК, — λ gt10 и λ gt11. Библиотека, клонированная в λ gt10, удобна для скрининга олиго- и полинуклеотидными зондами. В зависимости от цели исследования зондами могут служить клонированные фрагменты ДНК, суммарная геномная ДНК, синтетические олигонуклеотиды, соответствующие нужной последовательности аминокислот, ϕ РНК или кДНК. Второй вектор, λ gt11, представляет собой экспрессирующий вектор, который обеспечивает возможность синтеза

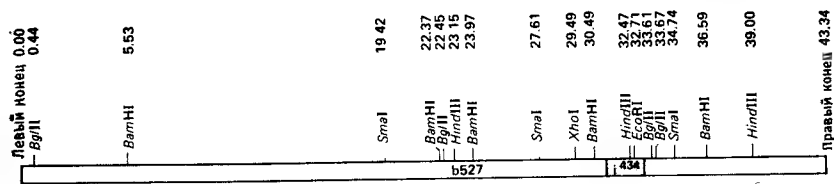


Рис. 1. Карта вектора λ gt10. Сайты рестрикции приведены с указанием расстояния (в т.п.н.) от левого конца вектора. Деления b527 захватывает область ДНК между 49,1 и 57,4% (по карте фага λ дикого типа). Замещение imm^{434} включает последовательности ДНК между 72,9 и 79,3%.

полипептида, кодируемого ДНК-вставкой [1]. Библиотеки кДНК в λ gt11 можно, таким образом, скринировать с помощью антител, что позволяет выявлять клоны, кодирующие те антигены, против которых направлены эти антитела [2].

1.1. λ gt10

λ gt10 ($imm^{434}b527$) содержит уникальный сайт расщепления *EcoRI*, находящийся внутри гена λ -репрессора (карта λ gt10 приведена на рис. 1). Если считать, что максимальный размер пригодной для упаковки ДНК составляет 105% от длины генома фага дикого типа, максимальная длина вставки для λ gt10 составит 7,6 т.п.н. Как показано в работе Мюррея с соавт. [3], введение фрагмента ДНК в ген репрессора (*ci*) приводит к появлению ci^- -рекомбинанта, образующего бляшки с прозрачным центром. Фаг ci^+ , например исходный вектор λ gt10, образует мутные бляшки. Таким образом, рекомбинантный ci^- -фаг, содержащий вставку в сайте рестрикции *EcoRI*, можно легко отличить от родительского ci^+ -фага по морфологии бляшек. Мюррей разработал ряд λ -векторов, вставка в которые производится в область иммунитета (*immunity insertion vectors*), что дает возможность визуального скрининга рекомбинантных фагов [3]. К этому семейству принадлежит и вектор λ gt10.

Многие из ранее описанных векторов, в которых чужеродная ДНК вводится в область иммунитета, например NM607, NM641, NM1149 и NM1150 [3, 4], можно использовать для клонирования относительно коротких фрагментов ДНК (например, кДНК). Шерер и др. [5] с успехом использовали λ -вектор NM641 *red^-* для получения библиотек кДНК. λ gt10 был сконструирован для того, чтобы иметь легко размножающийся λ -вектор, приспособленный для клонирования коротких фрагментов. Это свойство вектора придает ему важные преимущества, так как при упаковке стандартными методами в фаговые частицы, как правило, пакуются более длинные (близкие по длине к ДНК фага λ дикого типа) фрагменты. Если, как это обычно

бывает, эффективность упаковки *in vitro* зависит от размеров пакуемой ДНК, использование вектора λ gt10 позволяет увеличить выход клонированных коротких фрагментов ДНК примерно в 10 раз.

Так как длина вектора λ gt10 достаточна для упаковки и при отсутствии вставки, первичная библиотека в λ gt10 может содержать от 70 до 99% исходных, не несущих вставки фагов. Скрининг такой библиотеки — дело довольно трудоемкое. К счастью, эту трудность можно преодолеть, проведя селекцию против нереконбинантных фагов в ходе амплификации библиотеки. В данном случае в качестве хозяина используют штамм *E. coli*, несущий мутацию *hflA150* [7] (высокая частота лизогенизации). При инфекции фагом λ gt10 (или любым ci^+imm^{434}) рост ci^+ -фаговых частиц подавляется настолько, что бляшки не образуются вообще. В то же время фаг с генотипом ci^- формирует бляшки на газоне таких бактерий успешно. Рассев клонированной в λ gt10 библиотеки кДНК на хозяине *hflA150* эффективно удаляет из нее родительский фаг. Сходные результаты были независимо получены Шерером с соавторами, которые высевали клонированные в *red^-* λ -векторе NM641 библиотеки на *E. coli*, несущей мутацию *lyc7* (вероятно, аллельную локусу *hfl*) [5].

1.2. λ gt11

Структура экспрессирующего вектора λ gt11 (*lac5 ci857 nin5 S100*) приведена на рис. 2. Для введения чужеродной ДНК используется уникальный сайт расщепления *EcoRI*, расположенный внутри гена *lacZ* на расстоянии 53 п.н. с 5'-стороны от терминирующего кодона β -галактозидазы. Если считать, что максимальный пригодный для упаковки размер ДНК составляет 105% от длины λ -ДНК дикого типа, вектор λ gt11 способен принимать вставки величиной до 7,2 т.п.н. Фаг-вектор продуцирует температурочувствительный репрессор (*ci857*), неактивный при 42°C. Кроме того, этот вектор несет *amber*-мутацию (*S100*), делающую его неспособным к лизису хозяйской клетки, не имеющей *amber*-супрессора *supF*.

Так как участок, в который внедряется чужеродная ДНК, расположен внутри структурного гена β -галактозидазы, чужеродные последовательности могут экспрессироваться в виде полипептида, включенного в состав фермента β -галактозидазы. Скрининг библиотек геномной ДНК или кДНК, сконструированных с использованием λ gt11, можно проводить при помощи антител к продуцируемому рекомбинантными клонами антигенам. Обычно проводят скрининг 10^5 – 10^6 индивидуальных рекомбинантов, представленных в виде бляшек на газоне штамма *E. coli*, дефектного по протеазе *lon*. Белок, высвобож-

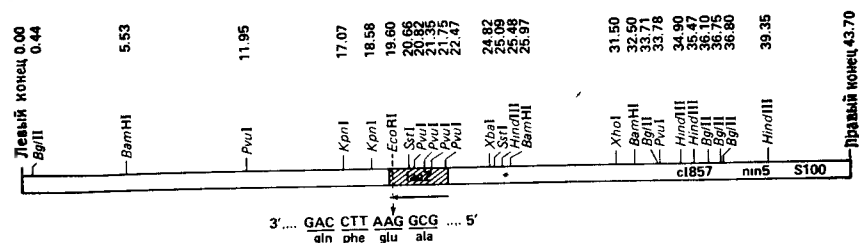


Рис. 2. Карта вектора λ gt11. Сайты рестрикции приведены с указанием расстояния (в т.п.н.) от левого конца вектора. Звездочкой обозначен att-сайт. Направление транскрипции *lacZ* показано горизонтальной стрелкой. Внизу приведены нуклеотидная последовательность области единичного *EcoRI*-сайта и кодируемая последовательность аминокислот.

дающийся при лизисе клеток внутри бляшки, иммобилизуют на нитроцеллюлозных фильтрах, накладывая эти фильтры на чашки. Связанный с нитроцеллюлозным фильтром белок зондируют антителами, специфичными к искомому антигену, и связанные антитела выявляют при помощи радиоактивно меченных вторичных антител или А-белка из *Staphylococcus aureus*. Рекомбинантные фаговые частицы, экспрессирующие искомый антиген, выделяют из тех зон чашки, которые соответствуют полученным на фильтрах сигналам.

При разработке экспрессирующего вектора λ gt11 и методики скрининга с помощью антител особое внимание уделялось проблемам, связанным с экспрессией в *E. coli* чужеродных белков. Прежде всего необходимо было обеспечить определенный уровень экспрессии чужеродных последовательностей ДНК. Эту задачу удалось решить благодаря слиянию чужеродных последовательностей с последовательностями гена β -галактозидазы *E. coli*. Вторая задача состояла в обеспечении контроля экспрессии белков, кодируемых чужеродной ДНК. Контроль необходим в тех случаях, когда чужеродный белок токсичен для клетки-хозяина и может убить ее до того, как синтезируется достаточное для иммунодетекции его количество. Эта трудность была сведена к минимуму благодаря использованию хозяина, продуцирующего в больших количествах *lac*-репрессор (продукт гена *lacI*), что предотвращает *lacZ*-зависимую экспрессию составного продукта в первые часы формирования бляшки. Когда число окружающих бляшку инфицированных клеток становится достаточно большим, *lacZ*-зависимую экспрессию запускают, инактивируя репрессор при помощи изопропил- β -D-тиогалактопиранозиды (IPTG). При этом заметное количество чужеродного антигена образуется даже в тех случаях, когда этот антиген токсичен для клеток. Третья задача, связанная с экспрессией чужеродных белков в *E. coli*, — обес-

печить их стабильность. Участок внутри гена β -галактозидазы, выбранный для вставки чужеродной последовательности, расположен вблизи С-концевой области β -галактозидазы, что, по-видимому, способствует стабильности составного продукта. Это особенно заметно для клеток, дефектных по *lon*-протеазе. Протеаза *lon* — это одна из протеаз, обуславливающих у *E. coli* деградацию чужеродных или аномальных белков [8, 9]. Наличие таких протеаз часто затрудняет накопление заметных количеств интересующего нас антигена в клетках дикого типа. Поэтому для повышения стабильности составных белков в ходе скрининга был использован хозяин, мутантный по гену *lon*.

Система клонирования с использованием вектора λ gt11 первоначально предполагала скрининг экспрессирующихся антигенов в бактериях, лизогенных по λ gt11-рекомбинантам [1]. Сейчас, однако, вместо этого подхода применяют скрининг фаговых бляшек [2]. Причина состоит в том, что большинство исследователей уже имеет опыт получения отпечатков фаговых бляшек на нитроцеллюлозных фильтрах. Еще важнее то, что, согласно нашим наблюдениям, некоторые из рекомбинантных фагов λ gt11 не способны формировать стабильные лизогены даже на клетках *hflA* (Р. Янг, неопубликованные данные). Эта проблема не решается и при использовании λ gt11-Amp^r [10]. В связи с этим для скрининга λ gt11 мы рекомендуем методику с использованием фаговых бляшек.

Так как вектор λ gt11 приспособлен для экспрессии, с его помощью можно нарабатывать полипептиды (в виде составного с β -галактозидазой продукта), кодируемые уже клонированными фрагментами ДНК. Гибридный белок продуцируют клетки *E. coli*, лизогенные по рекомбинантному фагу λ gt11. Так как стабильность белков обычно выше у штамма, дефектного по протеолизу, и в этом случае для получения препаративных количеств белка из соответствующего рекомбинантного лизогена используют *lon*⁻мутанты.

1.3. Факторы, обуславливающие выбор между λ gt10 и λ gt11

Так как скрининг с помощью олиго- и полинуклеотидных зондов возможен для библиотек, сконструированных как в λ gt10, так и в λ gt11, перед исследователем встает проблема выбора вектора. Главное преимущество библиотек в λ gt10 состоит в том, что для этого вектора отработан эффективный метод селекции, допускающий рост только рекомбинантных фагов. Кроме того, λ gt10 обладает высокой жизнеспособностью и образует крупные рекомбинантные бляшки, однородные по размерам и форме. Эти два свойства делают вектор λ gt10 более удобным для создания библиотек, скринировать которые предполагается с помощью нуклеиновых кислот. В отличие от λ gt10

вектор λ gt11 предназначен для высокоэффективной экспрессии чужеродной ДНК. В ходе амплификации библиотеки некоторые из рекомбинантов могут продуцировать полипептиды, уже в небольших количествах токсичные для фага или клетки-хозяина. Это приводит к уменьшению относительного содержания таких рекомбинантов в библиотеке. На практике некоторая неравномерность роста рекомбинантов λ gt11 сохраняется даже в присутствии *lac*-репрессора, подавляющего транскрипцию с промотора гена β -галактозидазы. Так как при амплификации библиотеки, клонированных в λ gt11, наблюдается ускоренный рост части рекомбинантных фагов, мы рекомендуем использовать библиотеки, сконструированные в λ gt11, только для скрининга при помощи антител.

1.4. Методы, описанные в этой главе

Отбирая методы для этой главы, авторы ставили перед собой цель достаточно полно описать конструирование библиотек кДНК и различные методики их скрининга. Разд. 2 содержит подробное изложение относительно простой процедуры синтеза кДНК и клонирования ее в λ gt10 и λ gt11. В разд. 3 обсуждаются подходы к скринингу λ -библиотек зондами на основе нуклеиновых кислот. Большая часть этого материала уже рассмотрена в других руководствах [6, 11]. В остальных случаях мы отсылаем читателя к оригинальным публикациям. В разд. 4 представлен метод скрининга при помощи антител библиотек, клонированных в экспрессирующем векторе λ gt11. Наконец, в разд. 5 говорится об очистке составных (включающих β -галактозидазу) полипептидов — продуктов экспрессии рекомбинантных клонов в λ gt11.

2. Синтез и клонирование двухцепочечной кДНК в λ gt10 и λ gt11

Схема описанного в этой главе метода получения и клонирования кДНК приведена на рис. 3. Обратная транскриптаза вируса миелобластома птиц катализирует синтез кДНК, используя в качестве матрицы poly(A⁺)-РНК, а в качестве затравки — oligo(dT)₁₂₋₁₈ [12]. Продукт (кДНК) отделяют от мРНК-матрицы путем тепловой денатурации. ДНК-полимераза I *E. coli*, используя в качестве затравки 3'-конец первой цепи, синтезирует вторую цепь кДНК [12, 13]. Одноцепочечная шпилька, соединяющая первую и вторую цепи, удаляется с помощью нуклеазы S1 [12]. Двухцепочечную кДНК затем обрабатывают метилазой *Eco*RI в присутствии S-аденозилметионина, для того чтобы предохранить сайты узнавания *Eco*RI от расщепления соответствующей рестриктазой. После краткой об-

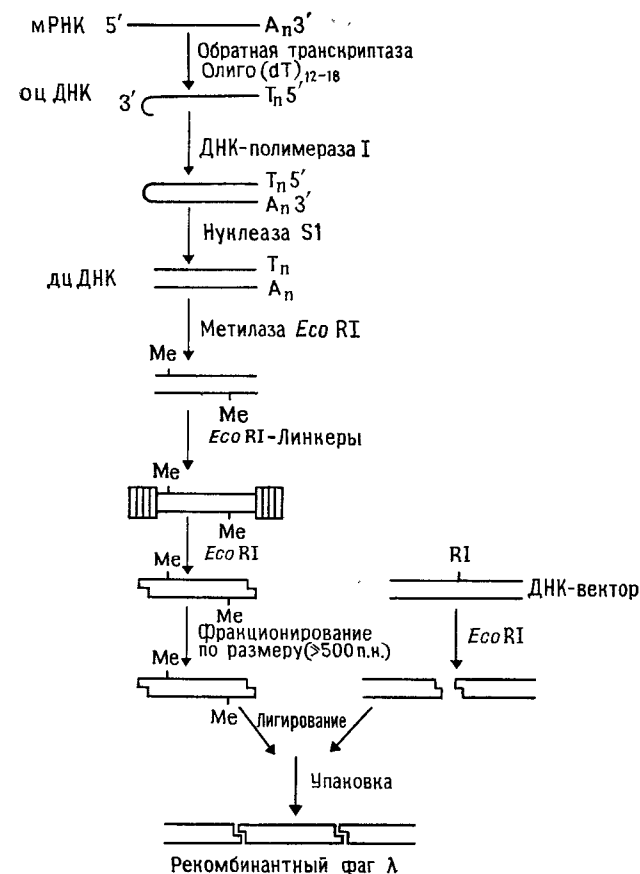


Рис. 3. Схема синтеза двухцепочечной кДНК и клонирования ее в λ gt10 и λ gt11. Объяснения см. в тексте.

работки ДНК-полимеразой I, увеличивающей число двухцепочечных молекул кДНК с тупыми концами [14], к этим концам с помощью лигазы присоединяют *Eco*RI-линкеры. Ненужную часть линкеров удаляют, обрабатывая ДНК рестриктазой *Eco*RI. Затем реакционную смесь пропускают через колонку с Био-Гелем А50m. Этот этап позволяет решить две задачи: 1) отделить кДНК от избытка линкеров, мешающих лигированию кДНК с векторной ДНК; 2) фракционировать двухцепочечную кДНК по размеру.

Фракции, содержащие двухцепочечную кДНК нужного размера (например, >500 п.н.), собирают, лигируют в небольшом объеме с расщепленным *Eco*RI вектором λ gt10 или λ gt11 и упаковывают *in vitro*. Образовавшиеся фаговые частицы рас-

севают на подходящем штамме *E. coli* и визуально определяют процент рекомбинантов. При использовании λ gt10 рекомбинантные фаги отличаются морфологией бляшек. В случае λ gt11 рекомбинантные фаги образуют бесцветные бляшки на *supF lacI^q*-хозяине в присутствии индуктора *lac*-оперона IPTG и хромогенного субстрата β -галактозидазы Xgal. После подсчета числа рекомбинантов библиотеку кДНК рассеивают для амплификации и приготовления реплик на нитроцеллюлозных фильтрах.

Для успешного клонирования кДНК весьма важны также две не описанные в этой главе методики: выделение полиаденилированной РНК из тотального препарата РНК при помощи аффинной хроматографии на oligo(dT)-целлюлозе и приготовление экстрактов для упаковки λ -ДНК in vitro. Эти методики приведены в работе [6]. Кроме того, надежная процедура приготовления экстрактов для упаковки in vitro описана в работе [5].

2.1. Ферменты

1. Обратная транскриптаза вируса миелобластоза птиц — фирмы Seikagaku America, Inc.

2. ДНК-полимераза I *E. coli*, выделенная из клеток *E. coli* 594 по методу [11], либо фирмы New England Biolabs.

3. ДНК-лигаза T4, выделенная из клеток *E. coli* E1150 по методу [11], либо фирмы New England Biolabs.

4. Нуклеаза S1 — фирмы Boehringer Mannheim Biochemicals.

5. Рестриктаза *EcoRI*, выделенная из клеток *E. coli* RY13 по методу [15], либо фирмы New England Biolabs.

6. Метилаза *EcoRI*, выделенная из клеток *E. coli* RY13 по методу [16], либо фирмы New England Biolabs.

7. Полинуклеотидкиназа T4 — фирмы Pharmacia P-L Biochemicals, Inc.

Приведенные здесь методы выделения ферментов не обязательно лучшие. Могут быть использованы и другие методы, и продукция других фирм.

2.2. Другие реагенты

1. 2'-Дезоксинуклеотид-5'-трифосфаты (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) — фирмы Pharmacia P-L Biochemicals, Inc. Приготовьте концентрированные растворы нуклеозидтрифосфатов в стерильной дистиллированной воде, доведите с помощью NaOH pH до 7–8 и храните при -70°C . Точную концентрацию нуклеотидов определите спектрофотометрически.

2. Аденозин-5'-трифосфат, динатриевая соль — фирмы Pharmacia P-L Biochemicals, Inc. Приготовление исходного раствора описано в пункте 1.

3. Oligo(dT)_{12–18} — фирмы Pharmacia P-L Biochemicals, Inc. Растворите в стерильной дистиллированной воде в концентрации 100 мкг/мл и храните при -70°C . Точную концентрацию определите спектрофотометрически.

4. S-Аденозил-L-метионина иодид, grade I фирмы Sigma Chemical Company. Приготовьте 10 мМ исходный раствор в 10 мМ натрий-ацетатном буфере, pH 5,0 и храните при -20°C . Перед использованием разбавьте в 100 раз (до 100 мкМ) дистиллированной водой.

5. Линкеры *EcoRI*. 5'-OH-d(GGAATTCC) фирмы Collaborative Research, Inc. Приготовьте исходный раствор 500 мкг/мл в 10 мМ трис-HCl pH 7,5, 1 мМ Na₃ ЭДТА и храните при -20°C .

6. Дезоксицитидин 5'-[α -³²P]трифосфат, 10 мКи/мл, ~800 Ки/ммоль, водный раствор — фирмы Amersham.

7. Аденозин-5'-[γ -³²P]трифосфат, 10 мКи/мл, >3000 Ки/ммоль, водный раствор — фирмы Amersham.

8. Изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (IPTG) — фирмы Sigma Chemical Company. Приготовьте 1 М раствор в стерильной дистиллированной воде и храните при -20°C .

9. 5-Бromo-4-хлоро-3-индолил- β -D-галактопиранозид (XGal) — фирмы Boehringer Mannheim Biochemicals. Приготовьте раствор с концентрацией 40 мг/мл в диметилформамиде и храните при -20°C .

10. Био-Гель A50m, 100–200 меш — фирмы Bio-Rad Laboratories. Реагенты 8 и 9 нужны только для клонирования в λ gt11.

2.3. Штаммы бактерий и фагов

2.3.1. Штаммы для клонирования в λ gt10

1. BNN93=*E. coli* *hsdR⁻ hsdM⁺ supE thr leu thi lacY1 tonA21*.

2. BNN102=BNN93 *hflA150* [chr::Tn10]. Конструирование BNN102 описано в работе [1].

3. λ gt10= λ srI λ 1° b527 srI λ 3° imm⁴³⁴ (srI434+) srI λ 4° srI λ 5°. λ gt10 сконструирован in vitro с использованием левого плеча NM518 [17] и правого плеча NM607 [3]. Равные массы ДНК NM518 и NM607 были смешаны, расщеплены *XhoI*, лигированы лигазой T4 и упакованы in vitro. Одна четверть полученных фагов должна была содержать нужный генотип. Фаговая ДНК была отобрана по рестриктной карте.

2.3.2. Штаммы для клонирования в λ gt11

1. BNN97=BNN93 (λ gt11). Генотип λ gt11 — *lac5* Δ (*shindIII* Δ 2—3) *srI* Δ 3° *c1857 srI* Δ 4° *nin5 crl* Δ 5° Sam100. Конструирование λ gt11 описано в работе [1].

2. Y1088=*E. coli* Δ *lacU169 supE supF hsdR⁻ hsdM⁺ metB trpR tonA21 proC::Tn5* (pMC9). pMC9=pBR322-*lacI*^q.

3. Y1089=*E. coli* Δ *lacU169 proA⁺ Δ lon araD139 strA hflA150* [chr::Tn10] (pMC9).

4. Y1090=*E. coli* Δ *lacU169 proA⁺ Δ lon araD139 strA supF*[*trpC22::Tn10*] (pMC9).

Конструирование Y1088, Y1089 и Y1090 описано в работе [2]. Штаммы, необходимые для клонирования в λ gt11, имеются в Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection). У Clontech Laboratories можно получить несколько рекомбинантных библиотек в λ gt11 и положительные контроли для иммуноскрининга. Расщепленные *EcoRI* и дефосфорилированные плечи λ gt11 продает фирма Promega Biotec.

2.4. Выращивание фаговых векторов и выделение векторной ДНК

2.4.1. Приготовление клеток для газона

Для посева фага приготовьте клетки BNN93, BNN102 и Y1088 так, как описано в работе Дэвиса и соавт. [11]. Нарастите клетки до стационарной фазы в среде LB (pH 7,5), содержащей 0,2% мальтозы. Клетки осадите и ресуспендируйте в 10 mM $MgCl_2$ (1/2 исходного объема культуры). Храните при 4°C. Для посева библиотеки используйте свежеприготовленные клетки.

2.4.2. Размножение λ gt10

Описанная ниже методика сводит к минимуму число фаговых частиц в препаратах вектора, образующих прозрачные бляшки. Отдельные препараты фага получают из индивидуальных бляшек и титруют. Тот из них, который при посеве дает наименьшее число прозрачных бляшек, отбирают для получения в высоком титре. Для приготовления векторной ДНК не следует выбирать фаголизаты, дающие при посеве более одной прозрачной бляшки на 10^4 , так как это приводит к появлению в библиотеке ложных рекомбинантов.

1. Для очистки фага расseyте его на свежей LB-чашке (pH 7,5), как описано в работе Дэвиса и соавт. [11], используя в качестве хозяина штамм BNN93.

2. С помощью стеклянных капилляров на 100 мкл отберите несколько индивидуальных мутных бляшек (вместе со столбиком агара) и получите из них индивидуальные фаголизаты на свежих чашках с LB-агаром (pH 7,5).

3. Оттитруйте каждый фаголизат и отберите тот, который содержит наименьшее число примесных мутантных фагов, образующих прозрачные бляшки.

4. Используйте выбранный фаголизат в качестве исходного препарата при получении фага в высоком титре. Для этого приготовьте десять чашек диаметром 150 мм, как описано в работе [11], но со средой LB (pH 7,5), к которой после автоклавирования добавлена глюкоза (до 0,2%). Добавление глюкозы увеличивает титр препарата λ gt10 в 10 раз. Для каждой чашки Петри диаметром 150 мм возьмите $2,5 \cdot 10^6$ фаговых частиц, 125—250 мкл клеток BNN93 и 5 мл мягкого LB-агара (pH 7,5). После 5—6 ч инкубации при 37°C на чашках образуется крапчатый газон. Чашки никогда не становятся совершенно прозрачными. Если выращивание продолжать, газон станет более мутным и титр фага уменьшится.

5. В момент наибольшего просветления газона перенесите чашки на 4°C. Когда чашки хорошо остынут, наложите на них по 10 мл холодного (4°C) буфера для разведения фага λ с несколькими каплями хлороформа. (Буфер для разведения фага λ содержит 10 mM трис-HCl pH 7,5; 10 mM $MgCl_2$; 0,1 mM Na_2EDTA .) Для диффузии фага в буфер проинкубируйте чашки в течение ночи при 4°C.

6. Соберите буфер, стараясь не захватить агар.

7. Осадите обломки бактерий центрифугированием в роторе Beckman JA-20 (или эквивалентном) в течение 15 мин при 10 000 об/мин и 4°C.

8. Осадите фаг центрифугированием в роторе Beckman SW27 в течение 90 мин при 23 000 об/мин и 4°C (в двух стаканах).

9. Ресуспендируйте осадок фага в каждом стакане в 1 мл буфера для разведения фага.

10. Перенесите суспензию фага в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и осадите крупные частицы в микроцентрифуге в течение 5 с.

11. Надосадок со стадии 10 нанесите на ступенчатый градиент $CsCl$, как описано Дэвисом и соавт. [11]. Отцентрифугуйте первый раз, наложив суспензию фага на верхнюю часть градиента, а второй раз — в обращенном градиенте, поместив суспензию на дно пробирки. Для очистки фага с 10 штоковых чашек диаметром 150 мм готовьте градиент в двух пробирках ротора Beckman SW50.1. Ступенчатые градиенты готовьте на химически чистом $CsCl$.

12. Очищенный в $CsCl$ фаг храните при 4°C.

13. Выделите фаговую ДНК при помощи экстракции формамидом, как описано Дэвисом с соавт. [11].

14. Средний выход ДНК λ gt10 с 10 чашек диаметром 150 мм составляет 0,5—1 мг.

2.4.3. Размножение λ gt11

Фаг λ gt11 получают путем индукции лизогенного по λ gt11 штамма BNN97 при температуре 43 °С. При этой температуре инактивируется температурочувствительный репрессор (*cI857*).

1. Рассейте BNN97 на отдельные колонии на чашках с агаром LB (рН 7,5) при 32 °С.

2. Для проверки лизогена на чувствительность к 42 °С переколите стерильной зубочисткой несколько индивидуальных колоний в ряд на две одинаковые чашки с LB-средой (рН 7,5). Одну из них инкубируйте при 42 °С, а другую — при 32 °С.

3. Убедившись в чувствительности клеток к температуре 42 °С, перенесите одну колонию в 10 мл LB-бульона (рН 7,5) и проинкубируйте ночь при 32 °С.

4. 10 мл ночной культуры внесите в 1 л LB-бульона (рН 7,5), к которому добавлен $MgCl_2$ до 10 мМ (32 °С). Проводите инкубацию с хорошей аэрацией при 32 °С до $ОП_{600} = 0,6$.

5. Быстро перенесите культуру в заранее нагретую до 43—44 °С водяную баню и проинкубируйте при этой температуре в течение 15 мин с хорошей аэрацией.

6. Понижьте температуру до 37—38 °С и продолжайте инкубацию с хорошей аэрацией в течение 3 ч. Не позволяйте культуре охлаждаться ниже 37 °С.

7. Добавьте к культуре 10 мл хлороформа и перемешивайте 10 мин при 37 °С. Суспензия должна стать прозрачной.

8. Удалите обломки бактерий центрифугированием в роторе Бескман JA-10 (или эквивалентном) в течение 10 мин при 6000 об/мин и 4 °С.

9. Соберите фаг центрифугированием в роторе Бескман JA-10 (или эквивалентном) в течение 8 ч при 8000 об/мин и 4 °С.

10. С помощью пастеровской пипетки тщательно ресуспендируйте осадок фага в 4 мл буфера для разведения. (Буфер для разведения фага λ содержит 10 мМ трис-НСl рН 7,5; 10 мМ $MgCl_2$; 0,1 мМ Na_2EDTA .)

11. Добавьте равный объем фагового буфера, насыщенного CsCl (используйте химически чистый CsCl).

12. Для формирования содержащей фаг зоны центрифугируйте в роторе Бескман SW50.1 48 ч при 35000 об/мин и 20 °С.

13. Отберите с помощью шприца содержимое зоны фага. Она должна находиться вблизи центра пробирки. Соберите фаг в объеме приблизительно 0,5 мл.

14. Добавьте равный объем буфера для разведения.

15. Очистите фаг в ступенчатом градиенте CsCl в роторе Бескман SW50.1, как описано Дэвисом и соавт. [11]. Первый раз нанесите фаг на верхнюю часть, а второй раз — на дно градиента.

16. Отберите содержащую фаг зону в минимально возможном объеме. Храните суспензию при 4 °С.

17. Выделите фаговую ДНК путем экстракции формамидом, как описано Дэвисом и соавт. [11].

18. Средний выход ДНК фага из 1 л культуры составляет 0,25—0,5 мг.

2.5. Методика синтеза и клонирования двухцепочечной кДНК в λ gt10 и λ gt11

Методика синтеза и клонирования двухцепочечной кДНК приведена в табл. 1—9. Текст разделов 2.5.1—2.13 содержит дополнительные объяснения.

2.5.1. Синтез первой цепи кДНК

Методика синтеза первой цепи кДНК приведена в табл. 1. Крайне важно, чтобы все реагенты и пластиковая посуда, используемые для синтеза первой цепи, не содержали следов

Таблица 1. Синтез первой цепи кДНК

1. Внесите реагенты в указанном ниже порядке в стерильную микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл (конечный объем смеси 50 мкл). Начальный объем воды должен быть таким, чтобы после добавления $poly(A)^+$ -РНК и обратной транскриптазы общий объем составил 34 мкл.

2. Добавьте 2 мкг¹⁾ $poly(A)^+$ -РНК в дистиллированной воде. Прогрейте смесь 3 мин при 70 °С и охладите во льду.

3. Добавьте в следующем порядке: 5 мкл десятикратного буфера для синтеза первой цепи²⁾; 5 мкл 10 мМ (ACGT)TP³⁾; 5 мкл $oligo(dT)_{12-18}$ (100 мкг/мл); 1 мкл 5'-[α -³²P]dCTP; 10—20 единиц⁴⁾ обратной транскриптазы из ВМП (конечный объем 50 мкл).

4. Проинкубируйте 1 ч при 42 °С.

5. Проткните крышку пробирки иглой. Денатурируйте дуплекс РНК: кДНК в кипящей водяной бане в течение 1,5 мин, затем охладите во льду. Замените крышку с отверстием на новую.

6. Прежде чем перейти к осуществлению следующих стадий (табл. 2), отберите 0,5 мкл продукта реакции для осаждения спиртом и анализа размеров продукта в щелочном агарозном геле (разд. 2.5.3).

¹⁾ Если реакция проводится при другой концентрации РНК, следует поддерживать постоянным соотношение РНК: $oligo(dT)$.

²⁾ Десятикратный буфер для синтеза первой цепи содержит 0,5 М трис-НСl рН 8,5 (измеряется при комнатной температуре); 0,4 М KCl; 0,1 М $MgCl_2$; 4 мМ ДДТ.

³⁾ d(ACGT)TP — это водный раствор, содержащий по 10 мМ dATP, dCTP, dGTP и dTTP (см. разд. 2.2).

⁴⁾ 1 единица обратной транскриптазы катализирует включение 1 наномоля dTMP в кислотонерастворимый продукт за 10 мин при 35 °С, если в качестве матрицы-затравки используется полирибоаденилат: дезокситимидилат.

РНКа́зы. Это касается и обратной транскрипта́зы. Для проверки обратной транскрипта́зы на РНКазную активность проинкубируйте несколько единиц фермента с 0,25 мкг суммарной РНК в 50 мМ трис-НСl pH 7,5; 100 мМ NaCl, 8 мМ MgCl₂ при 37 °C в течение 1 ч. Нанесите РНК на 1%-ный агарозный гель, приготовленный на трис-ацетатном буфере и содержащий 0,5 мкг/мл этидиумбромид. С помощью источника УФ-излучения проверьте, не деградировала ли РНК. Может оказаться необходимым очистить обратную транскрипта́зу от примесной РНКазной активности на колонке с Сефакрилом S200, как описано в работе [18].

Кроме того, необходимо, чтобы при синтезе первой цепи кДНК фермент присутствовал в избытке по отношению к матрице. Протитруйте фермент при постоянной концентрации poly(A)+РНК, измеряя количество синтезированной кДНК по включению радиоактивной метки в кислотонерастворимую фракцию. После того как убедитесь, что фермент присутствует в избытке, проверьте, линейно ли зависит количество синтезируемой кДНК (определяемое по включению метки в кислотонерастворимый материал) от количества добавленной в реакцию poly(A)+РНК. Убедитесь также, что включения метки не происходит при отсутствии в реакционной смеси РНК.

Масса синтезированной кДНК должна составлять от 5 до 50% массы poly(A)+РНК. Если известна удельная активность метки, эту величину можно оценить по количеству радиоактивных импульсов, включившихся в ДНК в ходе реакции. Причины плохого включения могут быть следующими:

1. РНК-матрица сильно деградирована.

2. В препарате РНК присутствует ингибитор фермента.

При наличии подходящего зонда деградацию poly(A)+РНК легче всего обнаружить, если разделить препарат в геле, перенести РНК на твердый носитель и прогибридизовать с радиоактивно меченным ДНК-зондом. Ингибитор можно зарегистрировать, смешав РНК с другим препаратом poly(A)+РНК, заведомо представляющим собой хорошую матрицу для обратной транскрипции и проверив, как присутствие вашего препарата влияет на матричную активность заведомо хорошей матрицы.

Наконец, необходимо проверить зависимость реакции синтеза первой цепи от oligo(dT)-затравки. При добавлении oligo(dT) включение радиоактивной метки в ДНК должно возрасти не менее чем в 10 раз. Причиной высокого уровня независимого от oligo(dT) включения метки иногда служит синтез кДНК, который обусловлен присутствием остаточных примесей ДНК и (или) рибосомной РНК в препаратах poly(A)+РНК. Продукты обратной транскрипции таких молекул мигрируют в щелочном агарозном геле в виде дискретных полос. Независимое от oligo(dT) включение метки иногда удается уменьшить

Таблица 2. Синтез второй цепи кДНК

1. В пробирку, содержащую 50 мкл продукта реакции синтеза первой цепи (стадия 5 табл. 1), внесите 50 мкл двукратного буфера для синтеза второй цепи¹⁾; 1 мкл 10 мМ d(ACGT)TP; 5 мкл или 90 единиц²⁾ гомогенной ДНК-полимеразы I (концентрация 1 мг/мл). Конечный объем реакции составит 106 мкл.

2. Проинкубируйте смесь 5 ч при 15 °C.

3. Прежде чем перейти к осуществлению следующих стадий (табл. 3), отберите 1 мкл продуктов реакции для электрофореза в геле.

¹⁾ Буфер для синтеза второй цепи содержит 100 мМ HEPES, доведенный до pH 6,9 KOH; 100 мМ KCl; 20 мМ MgCl₂.

²⁾ 1 единица ДНК-полимеразы I катализирует включение 10 нМ нуклеотида за 30 мин при 37 °C при использовании polyd(AT) в качестве матрицы-затравки.

с помощью дополнительной очистки poly(A)+РНК. Другая причина независимого от oligo(dT) включения метки может быть связана с качеством препарата обратной транскрипта́зы. По нашим наблюдениям уровень независимого от oligo(dT) синтеза в коммерческих препаратах обратной транскрипта́зы намного падает после дополнительной очистки их на колонке с Сефакрилом S200 [18]. Продукт независимого от oligo(dT) синтеза в этом случае гетерогенен по длине в отличие от продукта, образующегося за счет примеси ДНК или рибосомной РНК. Возможно, что в препаратах фермента могут присутствовать небольшие фрагменты ДНК или РНК, способные служить затравкой для синтеза кДНК на экзогенной РНК и удаляющиеся при отделении фермента от малых молекул на колонке. Это служит еще одним (кроме удаления РНКаз) поводом для дополнительной очистки обратной транскрипта́зы на колонке с Сефакрилом S200.

2.5.2. Синтез второй цепи кДНК

Соответствующая методика приведена в табл. 2.

2.5.3. Обработка нуклеазой S1

Эта процедура описана в табл. 3. Предварительно нужно протитровать нуклеазу S1 для определения оптимального количества фермента, необходимого для расщепления шпичечных структур, имеющихся на концах двухцепочечных кДНК. Для этого проинкубируйте двукратные разведения фермента (исходная концентрация около 1200 ед/мл) с радиоактивно меченным продуктом реакции синтеза второй цепи и проанализируйте пробы на щелочном агарозном геле. Выберите концентрацию S1, уменьшающую разброс по размерам двухцепочечной кДНК до значения, получаемого после реакции синтеза первой цепи (рис. 4).

Таблица 3. Обработка нуклеазой S1

1. В пробирку, содержащую 106 мкл продукта реакции синтеза второй цепи (стадия 2, табл. 2), добавьте 400 мкл буфера для S1¹⁾ и приблизительно 600 единиц нуклеазы S1²⁾. Конечный объем реакции примерно 506 мкл.
2. Пройнкубируйте 30 мин при 37°C.
3. Добавьте 5 мкл 1 М Na₄ЭДТА, отберите 5 мкл смеси для анализа щелочным гель-электрофорезом³⁾.
4. Экстрагируйте реакционную смесь равным объемом смеси фенол:CHCl₃ (1:1), насыщенной TE pH 7,5⁴⁾.
5. Перенесите водную фазу в другую микроцентрифужную пробирку. Экстрагируйте ее трижды равным объемом эфира, насыщенного TE (pH 7,5). Удалите эфир в течение нескольких минут при 37°C.
6. Добавьте 2 объема этанола. Пройнкубируйте 1 ч в смеси сухого льда с этанолом, а затем 24 ч при -20°C.
7. Осадите ДНК в микроцентрифуге (15 мин при 4°C). Осторожно удалите надосады пастеровской пипеткой. Высушите на воздухе.

¹⁾ Буфер для S1 содержит 30 mM ацетата натрия pH 4,4; 250 mM NaCl; 1 mM ZnCl₂.

²⁾ Количество нуклеазы S1 следует определить так, как указано в тексте разд. 2.5.3. Нуклеазу S1, полученную в сухом виде от фирмы Boehringer, растворяют в концентрации 1000 ед/мл. 1 единица нуклеазы S1 катализирует образование из одноцепочечной ДНК 1 мкг кислоторастворимых дезоксирибонуклеотидов за 30 мин при 37°C.

³⁾ Методика щелочного гель-электрофореза описана в тексте разд. 2.5.3.

⁴⁾ TE содержит 10 mM трис-HCl pH 7,5; 1 mM Na₂ЭДТА.

После проведения реакции размер ДНК в аликвоте определяют при помощи электрофореза в щелочном геле одновременно с отобранными на предыдущих стадиях (табл. 2 и 3) пробами. Добавьте к этим аликвотам по 1 мкг ДНК-носителя и осадите продукты реакции этанолом для удаления не включившегося 5'-[α-³²P]дСТР. Нанесите три образца и стандарты длины в соседние лунки 1,2%-ного агарозного геля, приготовленного на 50 mM NaCl; 2 mM ЭДТА. Проведите электрофорез, погрузив гель в 30 mM NaOH; 2 mM ЭДТА. Высушите гель и проэкспонируйте с рентгеновской пленкой. Радиоавтограф геля, на котором разделены продукты синтеза первой и второй цепей, а также кДНК, обработанная S1, представлен на рис. 4. Распределение по размерам продуктов синтеза первой цепи отражает распределение по размерам РНК-матрицы. После синтеза второй цепи средний размер продукта примерно удваивается.

Таблица 4. Реакция метилирования *EcoRI*-сайтов

1. Растворите осадок, полученный на стадии 7 табл. 3, в 20 мкл буфера для метилазы *EcoRI*¹⁾.
2. Добавьте 2 мкл 100 мМ раствора S-аденозил-L-метионина²⁾, 0,2 мкл раствора метилазы *EcoRI* (1,8 мг/мл) или количество фермента, достаточное для метилирования 1 мкг ДНК. Конечный объем реакционной смеси 22 мкл.
3. Пройнкубируйте 15 мин при 37°C, затем 10 мин при 70°C.

¹⁾ Буфер для метилазы *EcoRI* содержит 50 mM трис-HCl pH 7,5; 1 mM Na₂ЭДТА, 5 mM ДТТ.

²⁾ Раствор S-аденозил-L-метионина приготовьте по методике, приведенной в разд. 2.2.

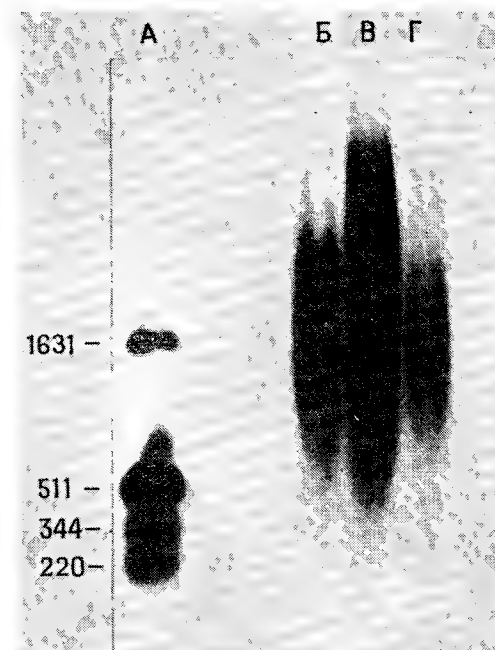


Рис. 4. Фракционирование кДНК по размеру. Аликвоты меченной ³²P кДНК разделяли электрофорезом в 1,2%-ном агарозном геле в щелочном буфере. Гель высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой. А — стандарты длины (указано число нуклеотидов); Б — продукт синтеза первой цепи; В — продукт синтеза второй цепи; Г — кДНК после обработки нуклеазой S1.

После обработки нуклеазой S1 распределение продукта по размеру должно стать таким, как продукта реакции синтеза первой цепи.

2.5.4. Метилирование кДНК с помощью *EcoRI*

Метилирование предохраняет кДНК от расщепления рестриктазой *EcoRI* при образовании липких концов с помощью синтетических линкеров (см. разд. 2.5.8). Методика метилирования приведена в табл. 4.

2.5.5. Достройка концов ДНК-полимеразой I

В ходе этой реакции увеличивается число тупых концов ДНК, к которым при помощи ДНК-лигазы T4 можно присоединять химически синтезированные линкеры. Процедура описана в табл. 5.

Таблица 5. Реакция достройки концов ДНК-полимеразой I

1. В пробирку, содержащую 22 мкл метилированной кДНК (стадия 3, табл. 4), внесите 2,5 мкл 0,1 М $MgCl_2$; 2,5 мкл 0,2 мМ d(ACGT)TP¹⁾; 0,25 мкл (5 единиц)²⁾ гомогенной ДНК-полимеразы I (1 мг/мл). Конечный объем реакционной смеси 27 мкл.
2. Проинкубируйте 10 мин при комнатной температуре и добавьте 10 мкл 50 мМ Na_3EDTA .
3. Добавьте в качестве носителя 1 мкг нерасщепленной ДНК λ -вектора (λ gt10 или λ gt11). Экстрагируйте равным объемом смеси фенол: хлороформ (1:1), насыщенной TE pH 7,5³⁾. Отцентрифугируйте 3 мин при комнатной температуре в микроцентрифуге.
4. Перенесите водную фазу в другую микроцентрифужную пробирку и экстрагируйте органическую фазу еще дважды 25 мкл TE pH 7,5. Объедините водные фазы и экстрагируйте их трижды равным объемом эфира, насыщенного TE pH 7,5.
5. После удаления эфирной фазы удалите остатки эфира, инкубируя смесь в течение нескольких минут при 37°C. Внесите ацетат натрия до конечной концентрации 0,3 М. Добавьте два объема этанола и осадите ДНК на спиртовой бане с сухим льдом в течение 30 мин.
6. Соберите осадок ДНК в микроцентрифуге (15 мин при 4°C). Удалите надосадок и промойте осадок один раз охлажденным до -20°C 70%-ным этанолом. Отцентрифугируйте еще раз.
7. Осторожно удалите этанол и высушите осадок на воздухе.

¹⁾ См. примечание 3 к табл. 1.²⁾ См. примечание 2 к табл. 2.³⁾ См. примечание 4 к табл. 3.2.5.6. Мечение *EcoRI*-линкеров по 5'-концам

Методика введения метки в линкеры приведена в табл. 6. Убедиться в том, что киназная реакция прошла, можно, если лигировать линкеры и проанализировать продукты при помощи гель-электрофореза и радиоавтографии.

1. Смешайте 1 мкл ³²P-меченых линкеров (100 нг) с 4 мкл 10 мМ трис-HCl pH 7,5; 10 мМ $MgCl_2$; 10 мМ ДДТ; 1 мМ АТР.
2. Добавьте 0,5 мкл ДНК-лигазы T4 (1,6 мг/мл) и проинкубируйте в течение 6—24 ч при 12—14°C.

Таблица 6. Мечение *EcoRI*-линкеров по 5'-концам

1. Смешайте в указанном порядке: дистиллированную воду (34 мкл минус объем киназы) 5 мкл десятикратного буфера для киназы¹⁾, 10 мкл раствора линкеров *EcoRI*²⁾, 1 мкл 5'-[γ -³²P] АТР и 30 единиц³⁾ полинуклеотидкиназы T4. Конечный объем 50 мкл.
2. Проинкубируйте 1 ч при 37°C.
3. Храните при -70°C. Перед использованием линкеров проверьте их способность к лигированию друг с другом (см. разд. 2.5.6).

¹⁾ Десятикратный буфер для киназы содержит 0,5 М трис-HCl pH 7,5; 0,1 М $MgCl_2$; 0,1 М ДДТ; 10 мМ АТР.²⁾ Линкеры растворяют в TE в концентрации 500 мкг/мл.³⁾ 1 единица киназы катализирует перенос 1 наномоля фосфата на 5'-ОН конец полинуклеотида с [γ -³²P] АТР за 30 мин при 37°C.Таблица 7. Присоединение *EcoRI*-линкеров к двухцепочечной кДНК

1. Растворите осадок (стадия 7, табл. 5) в 4,5 мкл раствора меченых *EcoRI*-линкеров (100 мкг/мл), полученных на стадии 3 табл. 6.
2. Добавьте 0,5 мкл 10 мМ АТР; 0,5 мкл ДНК-лигазы T4¹⁾ (1,6 мг/мл). Конечный объем 5,5 мкл.
3. Проинкубируйте 1—2 дня при 12—14°C.
4. Добавьте к продуктам реакции 5 мкл 50 мМ трис-HCl pH 7,5; 10 мМ $MgSO_4$; 200 мМ NaCl и прогрейте 10 мин при 70°C для инактивации лигазы.
5. Добавьте 1 мкл *EcoRI* (20 ед²⁾/мкл) до конечного объема 11,5 мкл и проинкубируйте 1 ч при 37°C.
6. Остановите реакцию добавлением 0,2 мкл 1 М Na_3EDTA .
7. Для удаления избытка линкеров пропустите двухцепочечную кДНК через колонку с Био-Гелем А50m так, как описано в разд. 2.5.8.

¹⁾ Объем добавляемого фермента не должен превышать 10% объема реакции, иначе концентрация глицерина окажется слишком большой.²⁾ 1 единица *EcoRI* полностью расщепляет 1 мкг ДНК pBR322 за 1 ч при 37°C.

3. Нанесите продукты реакции на 10%-ный полиакриламидный гель. В качестве контроля нанесите равное количество нелигированных меченых линкеров. Проводите электрофорез до тех пор, пока бромфеноловый синий не достигнет середины геля. Прозекспонируйте гель с рентгеновской пленкой. Основная часть метки должна содержаться в «лестнице», которую образуют олигомеризованные линкеры.

2.5.7. Присоединение к кДНК липких *EcoRI*-концов

Процесс проводят в две стадии. Сначала синтетические линкеры лигируют с двухцепочечной кДНК. Так как в результате к концам кДНК присоединяются образованные линкерами олигомеры, для удаления лишних линкеров продукты первой реакции расщепляют *EcoRI*. Процедура описана в табл. 7.

2.5.8. Удаление избыточных *EcoRI*-линкеров и фракционирование двухцепочечной кДНК по размеру

Фракционирование кДНК по размеру и удаление избытка линкеров проводят в одну стадию, пропуская реакционную смесь при комнатной температуре через колонку с Био-Гелем А50m. Колонку изготавливают из стеклянной трубки длиной 32 см и внутренним диаметром 0,2 см. В нижнюю часть колонки вставьте пробку из пористого полиэтилена или стеклянной ваты. Колонку силиконируйте, промывая ее в течение нескольких минут (под тягой) 1%-ным раствором диметилдихлорсилана в $CHCl_3$, а затем этанолом. К нижнему концу колонки при помощи парафилма присоедините иглу для инъекций. Иглу вставьте в полиэтиленовую трубку, достаточно длинную для

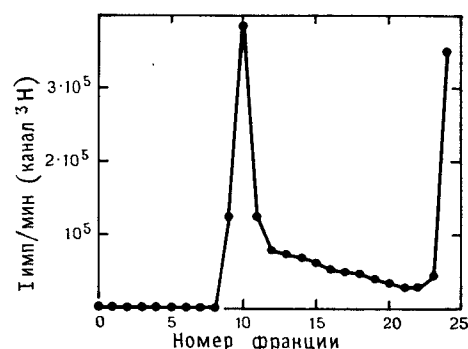


Рис. 5. Кривая элюции кДНК с колонки (хроматография на Био-Геле А50м). Двухцепочечную кДНК с присоединенными *EcoRI*-линкерами фракционировали по размеру по описанной в тексте методике. Фракции по 3 капли (~45 мкл) были собраны и просчитаны в сцинтилляционном счетчике по триетивному каналу. (В этом опыте кДНК синтезировали с использованием 5'-[α - 32 P] dCTP с большей удельной активностью, чем рекомендовано в тексте.)

соединения колонки с коллектором фракций (полиэтиленовая трубка РЕ20 с внутренним диаметром 0,38 мм и внешним диаметром 1,09 мм изготавливается фирмой Clay-Adams). К верхнему концу колонки через пластиковую трубку присоедините одноразовый пластиковый шприц без поршня, служащий в качестве резервуара. Био-Гель А50м (100—200 меш) промойте несколько раз буфером для колонки (10 мМ трис-НСl рН 7,5; 100 мМ NaCl, 1 мМ $\text{Na}_3\text{ЭДТА}$). Перед наполнением Био-Гелем нижнюю часть колонки заполните буфером. Для набивки резервуар заполните Био-Гелем и откройте колонку. Полный объем колонки — около 1 мл. Ее необходимо тщательно промыть (примерно 50 мл буфера), для того чтобы удалить из носителя ингибиторы лигазы.

Для калибровки через колонку пропустите радиоактивно меченные рестриктные фрагменты известной длины (например, меченные по 5'-концам *HinfI*-фрагменты рВR322) и проанализируйте фракции при помощи гель-электрофореза. К радиоактивным фрагментам (в 10 мкл ТЕ 7,5) добавьте 1 мкл 0,25%-ного раствора бромфенолового синего в 50%-ном глицерине и нанесите на колонку. Скорость протекания должна быть такой, чтобы краситель перемещался на 1 см приблизительно за 10 мин. Соберите фракции (по 3 капли) в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл (объем капли ~15 мкл). Удобно использовать микроколлектор фирмы Gilson. Проанализируйте аликвоту каждой фракции на 1,2%-ном агарозном геле. Гель высушите и проэкспонируйте с рентгеновской пленкой. Перед фракционированием кДНК колонку тщательно промойте буфером. После калибровки колонку можно использовать много раз.

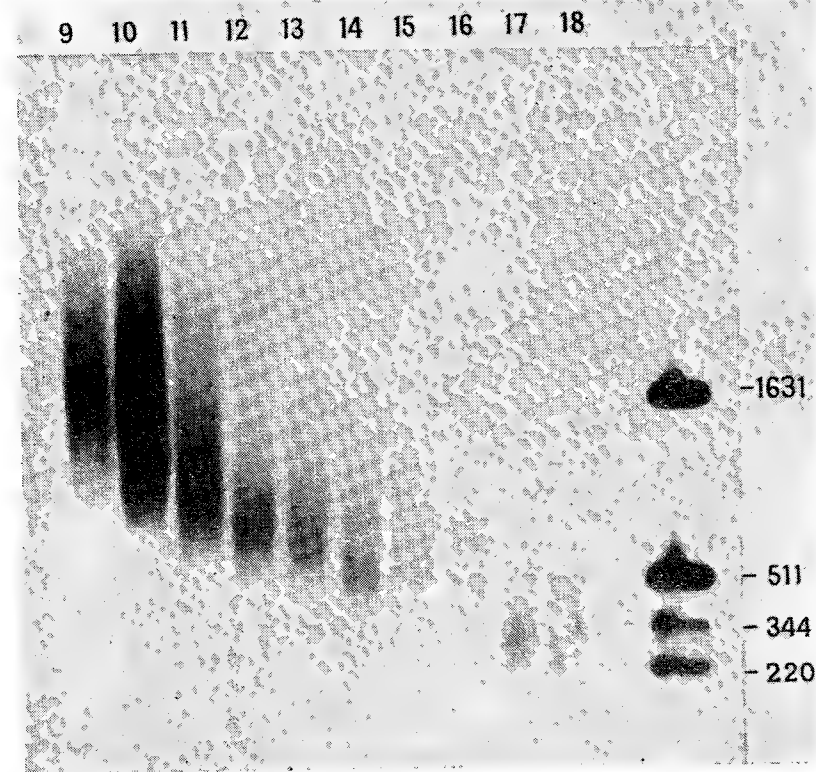


Рис. 6. Фракционирование по размеру меченной ^{32}P кДНК на колонке с Био-Гелем А50м. См. подпись к рисунку 5. Аликвоты фракций 9—18 с колонки наносили на 1,2%-ный агарозный гель. После электрофореза гель высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой. Размеры стандартов длины указаны в парах нуклеотидов.

К препарату кДНК добавьте 1 мкл 0,25%-ного раствора бромфенолового синего в 50%-ном глицерине. Отцентрифугируйте препарат 30 с в микроцентрифуге для удаления нерастворимых частиц, которые могут нарушить протекание. Нанесите препарат на колонку и установите нужную скорость протекания. Как и раньше, соберите фракции по 3 капли. Закройте пробирки, поместите их во флаконы для сцинтилляционного счетчика и просчитайте на ^3H -канале. Профиль элюции кДНК с колонки приведен на рис. 5.

Вместо калибровки колонки можно проанализировать аликвоты (~5%) каждой из фракций на геле вместе с радиоактивными стандартами длины. Радиоавтограф геля, на который

были последовательно нанесены фракции с колонки, представлен на рис. 6.

Подробно описанное здесь фракционирование кДНК по размеру на колонке с Био-Гелем А50m, по мнению многих исследователей, наиболее трудоемкая стадия клонирования кДНК. Тем не менее этот метод дает надежные результаты. Фракционирование кДНК можно провести также и путем электрофореза в геле легкоплавкой агарозы с последующей элюцией ДНК [19]. Этот метод более прост, однако его применение может привести к загрязнению кДНК присутствующими в огромном молярном избытке линкерами, которые способны «размазываться» по гелю и попадать во фракции большего размера. Лигирование линкера с векторной ДНК может привести к появлению в библиотеке «ложных» рекомбинантов. Риск загрязнения линкерами можно уменьшить, если перед нанесением на агарозный гель понизить содержание линкеров в препарате кДНК. Если олигомеры линкеров полностью расщеплены *EcoRI*, их можно удалить из смеси многократным осаждением этанолом, хроматографически [6] или осаждением спермином [20].

2.5.9. Расщепление ДНК λ gt10 или λ gt11 рестриктазой *EcoRI*

Для клонирования полученной двухцепочечной кДНК необходимо приготовить векторную ДНК. ДНК λ gt10 и λ gt11 выделяют методом, описанным в разд. 2.4. Так как разные партии вектора упаковываются *in vitro* с несколько различающейся эффективностью, новый препарат вектора перед клонированием необходимо проверить на эффективность упаковки (см. разд. 2.5.11). Если упаковка вектора *in vitro* происходит с удовлетворительной эффективностью, его рестрицируют *EcoRI* по методике, приведенной в табл. 8.

Для контроля полноты расщепления вектора упакуйте 1 мкг расщепленной *EcoRI* ДНК *in vitro*. Число образующихся при расщеплении такого фага бляшек должно быть не менее чем 10^3 раз ниже, чем число бляшек, получающихся после упаковки такого же количества интактной ДНК λ -вектора.

Таблица 8. Расщепление ДНК λ gt10 и λ gt11 *EcoRI*

1. Смешайте в указанном порядке: дистиллированную воду (45 мкл минус объем ДНК и *EcoRI*), 5 мкл десятикратного буфера для *EcoRI*¹⁾, 5 мкг ДНК λ -вектора в TE 7,5; 15 единиц *EcoRI*. Конечный объем реакционной смеси 50 мкл.

2. Пройнкубируйте 30 мин при 37 °С. Добавьте еще 15 единиц *EcoRI* и продолжите инкубацию еще 30 мин.

3. Добавьте 1 мкл 1 М Na₄ЭДТА и прогрейте 10 мин при 70 °С.

¹⁾ Десятикратный буфер для *EcoRI* содержит 0,5 М трис-НCl pH 7,5; 1 М NaCl; 0,1 М MgCl₂.

2.5.10. Лигирование кДНК с расщепленной *EcoRI* векторной ДНК

Методика лигирования фракционированной по размеру кДНК (разд. 2.5.8) с расщепленной *EcoRI* векторной ДНК приведена в табл. 9.

Таблица 9. Лигирование кДНК с векторной ДНК, расщепленной *EcoRI*

1. Отберите фракции, приготовленные по описанной в разд. 2.5.8 методике и содержащие кДНК нужного для клонирования размера. Если во фракциях содержатся нерастворимые частицы, отцентрифугируйте их в течение 15 мин в микроцентрифуге.

2. Добавьте к надосадку, помещенному в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку, 1 мкг расщепленной *EcoRI* векторной ДНК. Внесите ацетат натрия до 0,2 М и два объема этанола. Проинкубируйте ДНК 30 мин на спиртовой бане с сухим льдом.

3. Осадите ДНК в микроцентрифуге 15 мин при 4 °С. Промойте осадок охлажденным до -20 °С 70%-ным этанолом. Отцентрифугируйте 10 мин и осторожно удалите надосадок. Высушите осадок на воздухе.

4. Растворите осадок в 4 мкл 10 мМ трис-НCl pH 7,5; 10 мМ MgCl₂. Для отжига липких концов фага λ проинкубируйте смесь 15 мин при 42 °С.

5. Добавьте 0,5 мкл 10 мМ АТФ; 0,5 мкл 0,1 М ДТТ; 0,1 мкл ДНК-лигазы фага T4 (1,6 мг/мл). Объем реакционной смеси 5 мкл. Проинкубируйте 2—16 ч при 12—14 °С.

Параллельно с лигированием кДНК и вектора лигируйте 1 мкг расщепленного рестриктазой *EcoRI* вектора (без добавления вставки) и упакуйте *in vitro*. Оттитруйте полученный фаг на подходящем индикаторном штамме и определите, сколько ложных рекомбинантов появляется в отсутствие вставки. Для λ gt10 проверка заключается в подсчете доли появляющихся на хозяине BNN93 прозрачных бляшек. Методику проверки можно найти в разделе 2.5.12. В случае λ gt11 для контроля подсчитывают отношение числа бесцветных бляшек к числу синих бляшек при использовании в качестве хозяина штамма Y1088 и в присутствии IPTG и XGal (методика описана в разд. 2.5.13). При оценке эффективности клонирования следует учесть число появляющихся в отсутствие вставок ложных рекомбинантов (прозрачных бляшек для λ gt10 и бесцветных для λ gt11). Доля ложных (фоновых) рекомбинантов не должна увеличиваться после расщепления и лигирования векторной ДНК. Если после расщепления и лигирования вектора фон усиливается, то возможно, что λ -ДНК, ферменты или буферы загрязнены нуклеазами и (или) фрагментами ДНК.

2.5.11. Упаковка гибридных молекул *in vitro*

Подготовку экстрактов для упаковки *in vitro*, а также саму реакцию упаковки проводят согласно методике, описанной в работе [6] или так, как следует из работы [5].

2.5.12. Рассев гибридных фагов λ gt10 для скрининга или амплификации

Последующие операции проводят на газоне клеток BNN93 и BNN102, приготовленных так, как указано в разд. 2.4.1.

Определите, какова доля рекомбинантных фаговых частиц (образующих прозрачные бляшки). Для этого рассейте небольшую часть (0,01—0,1%) упакованных фагов на хозяине BNN93. Используйте чашки с обычной агаризованной средой LB (без глюкозы), так как на этой среде легче различить прозрачные и мутные бляшки. Полезно также выделить ДНК из нескольких прозрачных бляшек описанным в работе Дэвиса с соавт. [11] экспресс-методом и с помощью рестриктного анализа убедиться, что они содержат вставочные фрагменты. Небольшие вставки в λ gt10 легче всего обнаружить, расщепляя гибридную ДНК *Bam*HI или *Hind*III (вместо *Eco*RI), так как сайты для этих рестриктаз фланкируют сайт, по которому происходит внедрение чужеродной ДНК.

Для скрининга библиотеки зондами на основе нуклеиновых кислот рассейте упакованную библиотеку на чашках с LB-агаром (pH 7,5), используя в качестве хозяина мутант *hflA*150. С этих чашек можно получить фильтры-реплики так, как описано в работах [6, 11]. При определении плотности бляшек число бляшкообразующих единиц рассчитайте только по прозрачным бляшкам, так как мутные бляшки образуются на *hflA*150-хозяине с низкой эффективностью. λ gt10 — весьма жизнеспособный фаг, образующий очень крупные бляшки. Если для увеличения плотности бляшек на чашке нужно уменьшить их размер, следует либо увеличить число хозяйских клеток, либо использовать более старые и сухие чашки с LB-агаром.

Так как при амплификации библиотеки плохо растущие рекомбинанты, как правило вытесняются, мы рекомендуем вести скрининг библиотек сразу после упаковки. Если библиотеку все же необходимо амплифицировать перед скринингом, высейте фаг на свежие 150 мм чашки с LB-агаром (pH 7,5) (10^5 прозрачных бляшек на чашку), используя в качестве газона клетки BNN102 (125 мкл на чашку). Приготовьте фаголизаты так, как описано Дэвисом и соавт. [11]. Титр фага в таком препарате составляет обычно от $5 \cdot 10^{10}$ до 10^{11} б.о.е./мл. Храните препараты с хлороформом при 4°C. Для длительного хранения внесите диметилсульфоксид до 7% и поместите в глубокий холод (—70°C). При таком способе хранения титр фага снижается за несколько лет не более чем в 2—3 раза.

2.5.13. Рассев гибридных фагов λ gt11 для амплификации

Дефектный по протеазе *lon*-мутант Y1090, использующийся для посева библиотек фага λ gt11, имеет функционально активную систему рестрикции-модификации. В связи с этим полу-

ченную в λ gt11 библиотеку нельзя рассеивать на Y1090 сразу после упаковки, а следует сначала амплифицировать на *hsdR*[—]*hsdM*⁺-клетках Y1088.

Клетки Y1088 приготовьте согласно указаниям разд. 2.4.1. Чтобы при амплификации избежать вытеснения плохо растущих фагов, необходимо подавить синтез токсичных для хозяина полипептидов (синтезирующихся в виде составных белков, содержащих фрагмент β -галактозидазы), кодируемых рекомбинантными фагами. Поэтому для амплификации используют клетки Y1088, продуцирующие *lac*-репрессор.

Для определения доли рекомбинантов и проверки представительности библиотеки высейте небольшое число упакованных *in vitro* фаговых частиц (~ 100) при 42°C на газон *E. coli* Y1088, используя для этого чашку Петри диаметром 90 мм. В 2,5 мл мягкого агара на LB (pH 7,5) внесите 40 мкл раствора Xgal (40 мг/мл) и 40 мкл 1 М IPTG. На этой среде родительский фаг образует синие бляшки, а рекомбинанты — бесцветные (некоторые рекомбинантные бляшки иногда имеют слегка синеватую окраску). Полезно также выделить ДНК из нескольких бесцветных бляшек по методу Дэвиса с соавт. [11] и при помощи рестриктного анализа убедиться, что фаговые частицы, образующие эти бляшки, содержат фрагменты-вставки.

Для амплификации высейте библиотеку на свежие 150 мм чашки с LB-агаром (pH 7,5) (10^6 б.о.е. на чашку). В качестве газона используйте 600 мкл клеток Y1088. Инкубируйте чашки при 42°C. Приготовьте фаголизаты по методу Дэвиса и соавт. [11]. Титр фага в таком препарате составляет обычно от $5 \cdot 10^{10}$ до 10^{11} б.о.е./мл. Храните препараты так, как описано в разд. 2.5.12.

Скрининг библиотек в λ gt11 можно производить и прямо, без амплификации, если применить описанную ниже методику. 0,1 мл клеток Y1088 смешайте с таким объемом фаговой суспензии, который содержит 10^5 б.о.е. Адсорбируйте 15 мин при 37°C. После этого внесите 0,5 мл клеток Y1090, добавьте 7,5 мл мягкого LB-агара и немедленно вылейте на выдержанную двое суток чашку с LB-агаром (pH 7,5). Получение фаговых бляшек для приготовления нитроцеллюлозных фильтров-реплик описано в разд. 4.2 (начиная со стадии 6).

Попытки разработать генетический метод селекции рекомбинантных фагов λ gt11 оказались неудачными. Это можно объяснить тем, что подобная селекция основывается на различной способности клеток поддерживать рост рекомбинантных и не-рекомбинантных фагов. Некоторые из рекомбинантных фагов экспрессируют токсичные для клеток полипептиды, что делает такой подход малоприменимым. Вот почему количество рекомбинантных фаговых частиц должно быть преобладающим уже

в ходе конструирования библиотеки. Для увеличения доли рекомбинантов имеются два способа. Простейший и дающий наилучшие результаты подход состоит в том, что лигирование вставки и вектора проводят в минимальном объеме и таким образом, чтобы чужеродная ДНК присутствовала в молярном избытке над вектором. Например, при лигировании 1 мкг рестрицированной *EcoRI* ДНК λ gt11 с 0,5 мкг кДНК в объеме 2 мкл можно получить библиотеку, в которой доля рекомбинантных фагов составляет $\sim 30\%$. Следует, однако, помнить, что при таком высоком соотношении вставка/вектор могут появляться рекомбинантные молекулы, содержащие более одной вставки. Второй способ предусматривает обработку векторной ДНК щелочной фосфатазой для удаления необходимого при лигировании 5'-концевого фосфата. После этого два плеча вектора не могут лигироваться друг с другом в отсутствие вставки. К сожалению, качество большинства коммерческих препаратов щелочной фосфатазы таково, что после обработки ими нередко заметно снижается жизнеспособность вектора. Поэтому при использовании щелочной фосфатазы необходимо подобрать минимальное количество фермента, приводящее к уменьшению способности расщепленного *EcoRI* вектора к лигированию (в отсутствие вставки) на 90—95%.

2.6. Примеры получаемых результатов

2.6.1. Эффективность клонирования кДНК

Сведения об эффективности клонирования кДНК, которой удалось добиться разным исследователям с помощью описанной выше методики и вектора λ gt10, приведены в табл. 10. Аналогичные данные для вектора λ gt11 приведены в табл. 11. Средняя по двум таблицам эффективность составляет $6,6 \cdot 10^5$

Таблица 10. Эффективность клонирования кДНК в λ gt10

Источник poly(A)+РНК	Число клонов на 1 мкг poly(A)+РНК
Проростки кукурузы ¹⁾	$2,5 \cdot 10^5$
Побеги гороха ²⁾	$3,0 \cdot 10^5$
Дрожжи ³⁾	$7,5 \cdot 10^5$
Нематоды ⁴⁾	$5,0 \cdot 10^5$
Сетчатка глаза быка ⁵⁾	$1,3 \cdot 10^5$

¹⁾ Т. Кхунь, неопубликованные данные.

²⁾ А. Теологис, личное сообщение.

³⁾ Р. Янг, неопубликованные данные.

⁴⁾ Б. Мейер, личное сообщение.

⁵⁾ Дж. Натаис, личное сообщение.

Таблица 11. Эффективность клонирования кДНК в λ gt11

Источник poly(A)+РНК	Число клонов на 1 мкг poly(A)+РНК	Доля от общего числа б.о.е. в библиотеке, %
Дрожжи ¹⁾	$1,5 \cdot 10^6$	15%
Нематоды ²⁾	$1,2 \cdot 10^6$	8%

¹⁾ Р. Янг, неопубликованные данные.

²⁾ Б. Мейер, личное сообщение.

рекомбинантов на 1 мкг полиаденилированной РНК. Эти результаты показывают, что при использовании λ -векторов вполне возможно конструирование библиотек из 10^5 — 10^6 рекомбинантов при наличии лишь нескольких микрограммов poly(A)+РНК. Такие библиотеки достаточно велики для того, чтобы содержать последовательности, соответствующие даже самым редким мРНК.

Эффективность клонирования кДНК прямо зависит от качества используемых реагентов. Один из важнейших параметров — качество poly(A)+РНК-матрицы. Перед использованием poly(A)+РНК для синтеза кДНК ее необходимо тщательно проверить на отсутствие следов деградации. Необходимо также иметь высококачественные, концентрированные препараты ферментов, не загрязненные нуклеазами и фосфатазами. Многие исследователи предпочитают коммерческим препаратам самодельные ферменты. Еще один важный фактор — качество экстрактов для упаковки *in vitro*. Приведенные в табл. 10 и 11 эффективности клонирования получены с использованием экстрактов, дающих от $5 \cdot 10^7$ до 10^8 бляшкообразующих единиц на 1 мкг векторной ДНК. С появлением лучших методов приготовления упаковочных экстрактов эффективность клонирования кДНК может существенно возрасти.

2.6.2. Размер клонированных кДНК

Для того чтобы убедиться, что составляющие библиотеку фаги действительно содержат вставки, из 24 случайно выбранных бляшек библиотеки кДНК кукурузы (табл. 10) выделили ДНК и рестрицировали ее *EcoRI*. ДНК, полученная из всех 24 фаголизатов, содержала фрагменты-вставки со средней длиной 650 п.н.

Эта цифра означает, что средняя длина вставки меньше, чем длина структурного гена. Средняя длина клонированных кДНК в значительной степени зависит от того, какая фракция кДНК после фракционирования ее по размеру была выбрана

для лигирования. Многие исследователи, работающие как с зондами на основе нуклеиновых кислот, так и с антителами, считают, что библиотека, состоящая в основном из клонов неполных кДНК, вполне приемлема для выделения нужных генов. После выделения клон нужной кДНК его в свою очередь используют в качестве зонда для поиска более длинных клонов. С помощью такого метода последовательных приближений из большой библиотеки кДНК обычно удается выделить клон, содержащий полную кодирующую область искомой мРНК.

2.6.3. Структурные свойства клонов кДНК

Методика получения двухцепочечной кДНК, приведенная в этой главе, включает стадию обработки нуклеазой S1 [12]. Этот подход основан на том, что затравкой для синтеза второй цепи служит шпильчатая структура, образующаяся на 3'-конце первой цепи кДНК. Рядом исследователей отмечены связанные с этим подходом структурные аномалии кДНК. Во-первых, использование нуклеазы S1 для расщепления шпильчатой структуры приводит к тому, что в клонках кДНК отсутствуют последовательности, соответствующие 5'-концам мРНК. Несмотря на это, получение из больших библиотек кДНК клонов, содержащих предшествующие точке инициации трансляции (ATG) последовательности, обычно не вызывает затруднений. Вторая структурная аномалия, к которой приводит применение нуклеазы S1, состоит в том, что возможно появление клонов, 5'-концевая последовательность которых не соответствует последовательности мРНК [21]. Причиной этого служит, видимо, неполное расщепление нуклеазой S1. Поэтому полученный с использованием нуклеазы S1 клон необходимо проверять на совпадение всей его последовательности с последовательностью мРНК. Это можно сделать путем S1-анализа, описанного в работе [6]. Оба указанных выше структурных аномалии 5'-концевых последовательностей можно избежать, используя для получения кДНК методы, специально предназначенные для получения полноразмерных клонов. Эти методы, не использующие нуклеазу S1 [21, 22], по всей видимости, можно применять и при конструировании библиотек в λ gt10 и λ gt11.

3. Скрининг библиотек в λ gt10 и λ gt11 зондами на основе нуклеиновых кислот

Скрининг библиотек рекомбинантных ДНК в λ -векторах зондами на основе нуклеиновых кислот проводят при помощи гибридизации этих зондов с репликами фаговых бляшек на нитроцеллюлозных фильтрах. Скрининг библиотек кДНК про-

водят также, как и библиотек геномной ДНК. Метод этот хорошо разработан и описан в других руководствах [6, 11]. Там же можно найти методики приготовления фильтров-реплик. После предгибридизации фильтры-реплики обычно инкубируют с мечеными ^{32}P зондами (денатурированными или одноцепочечными) в гибридизационном буфере при температуре, приблизительно на 25°C меньшей ожидаемой температуры плавления дуплекса, образуемого зондом и фиксированной на фильтре ДНК. Иногда буфер для гибридизации содержит формамид. Для увеличения скорости и эффективности гибридизации в некоторых случаях ее проводят в присутствии декстрасульфата [23]. После завершения гибридизации фильтры промывают несколько раз; условия отмывки подбирают в зависимости от конкретной цели эксперимента. Затем фильтры высушивают и экспонируют с рентгеновской пленкой.

Применение зондов различного типа связано со стратегией выделения нужного клонка кДНК.

1. Если в качестве зонда используется уже клонированный фрагмент ДНК, то содержащую этот фрагмент плазмиду метят методом ник-трансляции. Суть его заключается в замещении нуклеотидов в составе фрагмента ДНК *in vitro* радиоактивно мечеными нуклеотидами при помощи ДНК-полимеразы I *E. coli*. Описание этого метода можно найти в работах [6, 11].

2. Зондом может служить смесь олигонуклеотидов, синтезированных химически на основании известной последовательности аминокислот. Если олигонуклеотиды достаточно длинны, можно пометить их 5'-концы и использовать непосредственно для скрининга библиотек кДНК при тщательно подобранных условиях [24]. С другой стороны, поскольку олигонуклеотиды представляют собой фрагменты цепи ДНК, комплементарной матричной РНК, их можно, индивидуально подобрав условия, отжечь с нефракционированным препаратом poly(A)⁺-РНК, достроить при помощи обратной транскриптазы и идентифицировать тот из них, который стимулирует синтез нужной последовательности ДНК [25]. Выбрав таким способом затравку, ее используют для синтеза кДНК-зонда при помощи обратной транскриптазы в присутствии меченых нуклеотидов и poly(A)⁺-РНК. Таким способом можно получить высокомеченый одноцепочечный зонд для скрининга библиотек кДНК.

3. Зонд может представлять собой РНК или одноцепочечную кДНК, полученную путем обратной транскрипции poly(A)⁺-РНК. Метод получения меченой РНК при помощи киназы описан в работе [26]. Методику приготовления кДНК-зонда можно найти в работе [27]. При использовании в качестве зондов РНК или кДНК в предгибридизационную и гибридизационную смеси необходимо вводить полиуридиловую кислоту (Pharmacia P-L Biochemicals, Inc или Collaborative Research,

Inс) в концентрации 250 мкг/мл. Она необходима для блокирования гибридизации зонда с участками клонированных кДНК, соответствующих 3'-концевым poly (A)-участкам мРНК.

4. Скрининг библиотек в λ gt11 зондами на основе антител

Скрининг библиотек в λ gt11 зондами на основе антител проводят после посева их на газоне клеток Y1090. Клетки Y1090:

1) содержат *lac*-репрессор, подавляющий *lacZ*-зависимую экспрессию генов в тех случаях, когда в среду не добавлен IPTG;

2) дефектны по протеазе *lon*, что обуславливает стабильность рекомбинантных белков;

3) несут мутацию *supF*, супрессирующую фаговую мутацию, обуславливающую дефектность фага-вектора по лизису (SI00).

Некоторые рекомбинантные фаги могут кодировать токсичные для хозяина белки. Чтобы рост таких рекомбинантов избирательно не подавлялся, формирование фаговых бляшек начинается при выключенной экспрессии с промотора *lacZ*. После того как значительная доля окружающих бляшку клеток окажется зараженной фагом, при помощи IPTG включают *lacZ*-зависимую экспрессию генов. На поверхность чашки помещают пропитанный IPTG нитроцеллюлозный диск. После нескольких часов инкубации нитроцеллюлозный фильтр, связавший белок лизировавшихся клеток, удаляют с чашки, промывают и инкубируют сначала с раствором антител, а затем для визуализации мест связывания антител — с раствором меченого ^{125}I А-белка из *Staphylococcus aureus*.

4.1. Реактивы

1. Круглые нитроцеллюлозные фильтры диаметром 82 или 132 мм с размером пор 0,45 мкм (Schleicher and Schuell).

2. Изопропил- β -D-тиогалактопиранозид (Sigma Chemical Company). Приготовьте 1 М раствор в стерильной дистиллированной воде и храните при -20°C .

3. Эмбриональная телячья сыворотка (HyClone). Перед использованием профильтруйте через нитроцеллюлозный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

4. Меченный ^{125}I А-белок из *Staphylococcus aureus*, удельная активность 30 МКи/мг (ICN).

4.2. Методика скрининга библиотек в λ gt11 зондами на основе антител

1. Рассейте *E. coli* Y1090 штрихом для получения отдельных колоний на чашках с LB-агаром (рН 7,5), содержащих 50 мкг/мл ампициллина. Проинкубируйте при 37°C .

2. Отберите индивидуальную колонию Y1090 в пробирку с LB-бульоном (рН 7,5) и инкубируйте при 37°C с хорошей аэрацией.

3. Для каждой чашки диаметром 90 мм смешайте 0,2 мл культуры Y1090 с 0,1 мл разведения фага, содержащего $3 \cdot 10^4$ б.о.е. библиотеки в λ gt11. Для чашек диаметром 150 мм возьмите 0,6 мл бактериальной культуры Y1090 и до 10^5 б.о.е. λ gt11.

4. Адсорбируйте фаг на клетках 15 мин при 37°C .

5. Добавьте к культуре 2,5 мл (чашки диаметром 90 мм) или 7,5 мл (чашки диаметром 150 мм) мягкого LB-агара (рН 7,5) и вылейте смесь на чашки с LB-средой (рН 7,5). Чтобы мягкий агар хорошо прилипал, чашки должны быть сухими (т. е. залиты не менее двух дней назад).

6. Проинкубируйте чашки 3—4 ч при 42°C .

7. Перенесите чашки на 37°C , не позволяя им охлаждаться ниже 37°C .

8. Наложите на каждую чашку круглый нитроцеллюлозный фильтр, заранее пропитанный 10 мМ водным раствором IPTG, а затем высушенный.

9. Проинкубируйте 2—3 ч при 37°C . (Если нужен дубликат реплики, после удаления первого фильтра наложите новый и продолжайте инкубацию еще 2—3 ч.)

10. Дальнейшие операции можно проводить при комнатной температуре. Быстро отметьте положение фильтра на чашке иглой, смоченной водостойкими чернилами, и осторожно снимите фильтр.

11. На всех последующих стадиях фильтры не должны высухать. Промывку и инкубацию фильтров проводите при осторожном покачивании сосуда. Сполосните фильтры в TBS (TBS содержит 50 мМ трис-HCl рН 8,0; 150 мМ NaCl).

12. Проинкубируйте фильтры 15—30 мин в TBS + 20% эмбриональной телячьей сыворотки (FCS), используя 5 мл смеси на фильтр диаметром 82 мм или 10 мл на фильтр диаметром 132 мм.

13. Проинкубируйте фильтры 1 ч в смеси TBS + 20% эмбриональной телячьей сыворотки + антитела, нанося по 5 мл смеси на фильтр диаметром 82 мм или 10 мл на фильтр диаметром 132 мм. Сывороточные антитела или очищенные IgG (в концентрации 10 мг/мл) разбавьте в 100 раз TBS + 20%

телячьей сыворотки. Этот раствор можно использовать несколько раз.

14. Промойте фильтры 5—10 мин в TBS.

15. Промойте фильтры 5—10 мин в TBS + 0,1% NP-40.

16. Снова промойте фильтры 5—10 мин в TBS.

17. Сполосните фильтры TBS + 20% эмбриональной телячьей сыворотки (5 мл на фильтр диаметром 82 мм или 10 мл на фильтр диаметром 132 мм).

18. Перенесите фильтры в TBS + 20% эмбриональной телячьей сыворотки, содержащей меченный ^{125}I А-белок (10^6 имп/мин на фильтр диаметром 82 мм, удельная активность 30 мКи/мг). Используйте 5 мл смеси для фильтра диаметром 82 мм или 10 мл — для фильтра диаметром 132 мм. Проинкубируйте 1 ч при комнатной температуре.

19. Промойте фильтры TBS; TBS + 0,1% NP-40, затем снова TBS (см. стадии 14—16).

20. Высушите фильтры и проэкспонируйте с рентгеновской пленкой (Kodak X-Omat AR) и усиливающим экраном (Cronex Lightning Plug) при -70°C .

21. Для проверки предполагаемого положительного сигнала вырежьте столбик агара из участка чашки, соответствующего сигналу на фильтре. Проинкубируйте в фаговом буфере не менее 1 ч.

22. Рассейте полученный фаг и повторяйте скрининг с антителами до тех пор, пока все бляшки не будут давать положительный сигнал.

4.3. Комментарии к методике скрининга библиотек антителами

1. Для выделения генов из библиотек в $\lambda\text{gt}11$, сконструированных с использованием кДНК, или геномной ДНК разных организмов — от бактерий до млекопитающих, — с успехом использовались поликлональные антитела. Большую роль при этом играет качество зонда. Поликлональные антитела имеют преимущество перед моноклональными, так как антитела поликлональной популяции обычно узнают множество эпитопов. Как и следовало ожидать, антитела с высоким титром дают лучшие сигналы, чем антитела с низким титром. Как правило, антитела, дающие хороший сигнал при вестерн-блот-анализе, хороши и для скрининга библиотек в $\lambda\text{gt}11$.

2. Поликлональные антитела часто содержат компоненты, связывающиеся с продуцируемыми в норме антигенами *E. coli*. Чтобы уменьшить такое «фоновое» связывание, эти компоненты следует удалить из препарата антител. Лучше всего проинкубировать антитела с лизатом *E. coli*, иммобилизованным на сефарозе (например, активированный CNBr) либо на нитроцеллюлозных фильтрах. Приготовьте лизат *E. coli* BNN97 методом,

описанным в разд. 5. Для уменьшения вязкости обработайте его ультразвуком или ДНКазой. Иммобилизуйте его на активированной CNBr сефарозе согласно инструкции фирмы-изготовителя. Для иммобилизации на нитроцеллюлозных фильтрах просто погрузите фильтры в лизат, а затем промойте их TBS. Разбавьте антитела приблизительно в 10 раз TBS + 20% эмбриональной телячьей сыворотки и проинкубируйте их с сефарозой или фильтрами 15—30 мин. Отделите антитела от твердого носителя (для удаления гранул сефарозы достаточно центрифугирования) и повторите операцию с новой порцией сефарозы или фильтров. Для удаления из антител основной массы анти-*E. coli* компонента обычно хватает двух промывок. Так как в процессе скрининга раствор антител используется неоднократно, остатки анти-*E. coli* компонента удаляются и в ходе использования зонда. Поэтому по мере использования зонда фон уменьшается.

3. Препарат разведенных антител можно использовать неоднократно. С одним и тем же препаратом иногда можно провести до десяти операций скрининга.

4. Хотя эмбриональная телячья сыворотка — прекрасный протектор для антител, ее можно заменить намного более дешевым препаратом — альбумином куриного яйца (10 мг/мл). Пока еще, однако, не вполне ясно, работает ли он так же хорошо, как сыворотка, при многократном использовании антител.

5. Получение рекомбинантного антигена из бактерий, лизогенизированных рекомбинантным фагом $\lambda\text{gt}11$

Часто требуется получить в препаративных количествах полипептид, кодируемый клонированным участком ДНК. В некоторых случаях (например, для радиоиммунологического анализа) достаточно неочищенного лизата *E. coli*, содержащего кодируемый нужным клоном антиген. Лизат, содержащий рекомбинантный антиген, можно получить при экспрессии рекомбинантного фага $\lambda\text{gt}11$ в лизогене *E. coli* Y1089. Клетки Y1089:

1) содержат *lac*-репрессор (продукт гена *lacI*), подавляющий *lacZ*-зависимую экспрессию генов в тех случаях, когда в среде отсутствует IPTG;

2) дефектны по протеазе *lon*, что повышает стабильность рекомбинантных белков;

3) несут мутацию, увеличивающую частоту лизогенизации (*hflA150*).

Для получения рекомбинантного белка клетки Y1089 лизогенизируют нужным клоном $\lambda\text{gt}11$. Лизогенную культуру ин-

кубируют до высокой плотности клеток, индуцируют *lacZ*-зависимую продукцию составного белка добавлением IPTG, затем клетки собирают и лизируют.

5.1. Лизогенизация клеток Y1089 рекомбинантным фагом

1. Инкубируйте клетки Y1089 в LB-бульоне (pH 7,5), содержащем 0,2% мальтозы.

2. Инфицируйте клетки рекомбинантным фагом λ gt11: множественность инфекции ≈ 5 , адсорбция в течение 20 мин при 32°C в LB-бульоне (pH 7,5), содержащем 10 mM $MgCl_2$.

3. Посейте клетки на LB-агар (pH 7,5), так чтобы на одну чашку приходилось примерно 200 клеток, и инкубируйте при 32°C (при этой температуре функционирует температурочувствительный репрессор фага).

4. Выросшие индивидуальные колонии проверьте на чувствительность к температуре 42°C. Для этого с помощью стерильных зубочисток переколите колонии на две LB-чашки (pH 7,5). Проинкубируйте одну из них при 42°C, а другую — при 32°C.

5. Клоны, растущие при 32°C, но не растущие при 42°C, можно считать лизогенами. Частота появления лизогенов составляет 10—70%.

5.2. Приготовление неочищенного лизата из рекомбинантных лизогенов λ gt11

1. Засейте 100 мл среды LB (pH 7,5) отдельной колонией рекомбинантного лизогена Y1089. Проинкубируйте при 32°C с хорошей аэрацией.

2. Когда оптическая плотность культуры при 600 нм достигнет 0,5, как можно быстрее поднимите температуру до 42—45°C и при этой температуре проинкубируйте культуру 20 мин с хорошей аэрацией.

3. Добавьте IPTG до 10 mM.

4. Проинкубируйте культуру примерно 60 мин при 37—38°C. (Не охлаждайте культуру ниже 37°C.) Иногда на этой стадии лизоген Y1089 лизируется несмотря на то, что клетки Y1089 не супрессируют мутацию λ gt11, обуславливающую дефектность по лизису (S100). Это может быть следствием, во-первых, неполного блокирования лизиса *amber*-мутацией S100 и, во-вторых, накопления чужеродных белков, часто облегчающих лизис *E. coli*. Поэтому для каждого индивидуального лизогена следует подобрать максимальное время инкубации при 37—38°C, при котором лизиса еще не происходит.

5. Как можно быстрее перенесите клетки в центрифугу и осадите в течение 5 мин при 5000 об/мин и 24—37°C в роторе Beckman JA-10. Для некоторых лизогенов резкое изменение температуры при осаждении клеток приводит к увеличению

скорости протеолиза, поэтому центрифугирование проводят при температуре от 24 до 37°C.

6. Быстро ресуспендируйте клетки в подходящем для белков буфере (1/10—1/20 исходного объема культуры).

7. Немедленно заморозьте суспензию клеток в жидком азоте.

8. Оттаивание замороженных клеток приводит к практически полному лизису индуцированных лизогенов.

5.3. Выделение составного (содержащего фрагмент β -галактозидазы) белка из неочищенного лизата рекомбинантных лизогенов λ gt11

Если для дальнейшей работы необязательно иметь очищенный антиген, то можно использовать непосредственно лизат, полученный по методике из разд. 5.2. Если же необходим чистый антиген, то составной белок можно очистить несколькими способами. Самый быстрый способ очистки основан на большом размере такого белка (только его β -галактозидазная часть имеет молекулярную массу 114 кДа). Поскольку немногие белки *E. coli* крупнее β -галактозидазы, составной белок можно отделить от других электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS). Для получения больших количеств денатурированного белка обычно используют препаративные гели. Если чистый антиген необходим в нативной форме, для его очистки применяют стандартные методы хроматографии на колонках.

Благодарности

Мы благодарим всех исследователей, внесших вклад в разработку этих методов. Прежде всего мы приносим благодарность Стюарту Шереру, который, во-первых, указал нам на необходимость разработки λ -вектора для клонирования и экспрессии кДНК, а во-вторых, вместе с Барбарой Мейер предложил использовать *hfl*-хозяина для селекции против фага *CI⁺imm⁴³⁴*. Мы благодарны Дэвиду Кэмпбу, на чьей методике основаны начальные стадии процедуры синтеза кДНК, и Томасу Сен-Джону, участвовавшему как в обсуждении процедуры синтеза кДНК, так и в разработке метода скрининга зондами на основе антител. Мы признательны Эндрью Хойту, предоставившему нам мутант *hflA150*, и Джереми Натансу за ценные замечания и радиоавтограммы, приведенные на рис. 4 и 6. Мы также благодарим многих исследователей, проверивших приведенные методики и высказавших ценные замечания. Работа финансировалась грантами BARD и NIH 6M 21891, предоставленными Р. Дэвису.

Литература

1. Young R. A., Davis R. W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 1194 (1983).
2. Young R. A., Davis R. W., Science, **222**, 778 (1983).
3. Murray N. E., Brammar W. J., Murray K. Mol. Gen. Genet., **150**, 53 (1977).
4. Murray N. E. In: Lambda II, Hendrix R. W., Roberts J. W., Stahl F. W., Weisberg R. A. (eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, p. 395, 1983.
5. Scherer G., Telford J., Baldari L., Pirrotta V. Dev. Biol., **86**, 438 (1981).
6. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1982. [Имеется русский перевод: Маниатис Т., Фриш Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984.]
7. Hoyt M. A., Knight D. M., Das A., Miller H. I., Echols H. Cell, **31**, 565 (1982).
8. Goldberg A. L., St. John A. C. Annu. Rev. Biochem., **45**, 747 (1976).
9. Charnay P., Gervais M., Louise A., Galibert F., Tiollais P. Nature, **286**, 893 (1980).
10. Kemp D. J., Coppel R. L., Cowman A. F., Saint R. B., Brown G. V., Anders R. F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 3787 (1983).
11. Davis R. W., Bolstein D., Roth J. R. Advanced Bacterial Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, 1980.
12. Efstratiadis A., Kafatos F. C., Maxam A. M., Maniatis T. Cell, **7**, 279 (1976).
13. Wickens M. P., Buell G. N., Schimke R. T. J. Biol. Chem., **253**, 2483 (1978).
14. Seeburg P. H., Shine J., Martial J. A., Baxter J. D., Goodman H. M. Nature, **270**, 486 (1977).
15. Modrich P., Zabel D. J. Biol. Chem., **251**, 5866 (1976).
16. Rubin R. A., Modrich P. J. Biol. Chem., **252**, 7265 (1977).
17. Murray K., Murray N. E. J. Mol. Biol., **98**, 551 (1975).
18. Wahl G. M., Padgett R. A., Stark G. R. J. Biol. Chem., **254**, 8679 (1979).
19. Sealey P. G., Southern E. M. In: Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach, Rickwood D. and Hames B. D. (eds.), IRL Press, Oxford, p. 39, 1983.
20. Hoopes B. C., McClure W. R. Nucleic Acids Res., **9**, 5493 (1981).
21. Land H., Grez M., Hauser H., Lindenmaier W., Schütz G. Nucleic Acids Res., **9**, 2251 (1981).
22. Gubler U., Hoffman B. J. Gene, **25**, 263 (1983).
23. Wahl G. M., Stern M., Stark G. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **76**, 3683 (1979).
24. Suggs S. V., Wallace R. B., Hirose T., Kawashima E. H., Itakura K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 6613 (1981).
25. Houghton M., Stewart A. G., Doel S. M., Emtage J. S., Eaton M. A. W., Smith J. C., Patel T. P., Lewis H. M., Porter A. G., Birch J. R., Cartwright T., Carey N. H. Nucleic Acids Res., **8**, 1913 (1980).
26. Maizels N. Cell, **9**, 431 (1976).
27. St. John T. P., Davis R. W. Cell, **16**, 443 (1979).

ЕЩЕ ОДНА МЕТОДИКА СИНТЕЗА ДВУХЦЕПОЧНОЙ КДНК ДЛЯ КЛОНИРОВАНИЯ В ФАГОВЫХ И ПЛАЗМИДНЫХ ВЕКТОРАХ

Кристин Дж. Уотсон и Джеймс Ф. Джексон

1. Введение

В этой главе описывается еще один метод синтеза двухцепочечной кДНК, пригодной для клонирования в различных векторах. В его основе лежит новый способ синтеза второй цепи кДНК, предложенный Окаемой и Бергом [1] для клонирования кДНК в плазидах. Традиционный метод подразумевает обработку гибрида мРНК — кДНК (продукта реакции синтеза первой цепи) щелочью для расщепления РНК. Затравкой для синтеза второй цепи в этом случае служит «шпильчатая» структура, находящаяся на 3'-конце молекулы кДНК [2]. Эта структура, а также те 5'-концевые участки первой цепи, которые не были скопированы при синтезе второй цепи (и остались одноцепочечными), удаляются для последующего присоединения линкеров путем обработки нуклеазой S1 из *Aspergillus oryzae*. В нашей методике продукт реакции синтеза первой цепи не обрабатывается щелочью, а используется как субстрат для обработки РНКазой H, ДНК-полимеразой I *E. coli* и ДНК-лигазой *E. coli* в присутствии дезоксирибонуклеозидтрифосфатов. РНКазы H, внося в РНК одноцепочечные разрывы, образует фрагменты-затравки, подобные фрагментам Оказаки, которые и служат субстратом для замещения РНК на ДНК (с участием ДНК-полимеразы I). ДНК-лигаза *E. coli* способна «зашивать» одноцепочечные разрывы, но в отличие от ДНК-лигазы T4 не может лигировать молекулы двухцепочечной кДНК друг с другом (при этом могли бы образоваться артефактные кДНК). Двухцепочечная кДНК после присоединения линкеров и образования липких концов при помощи рестриктазы пригодна для клонирования в векторах, предназначенных для скрининга как зондами на основе нуклеиновых кислот, так и антителами. Подробно изложенная ниже методика должна представлять интерес для большого числа исследователей. Она описывает получение двухцепочечной кДНК с *EcoRI*-концами, пригодной для клонирования в высокоэффективных векторах на основе фага λ. В недавно появившейся работе [3] независимо описана сходная методика.

Векторы, принимающие вставку в область иммунности, такие, как NM607 [8], NM1149 [4], λgt10 (см. гл. 2) и Харон 7 или Харон 16 [5], предназначены для клонирования молекул с *EcoRI*-концами. Харон 7 и NM1149 пригодны также для кло-

нирования фрагментов ДНК, полученных при расщеплении *HindIII*. Скрининг получаемых в этих векторах библиотек обычно проводят зондами на основе нуклеиновых кислот. По нашим данным и данным других авторов [6] эффективность клонирования в них превышает $2 \cdot 10^7$ бляшкообразующих единиц (б.о.е.) на 1 мкг двухцепочечной кДНК. Такая высокая эффективность объясняется, по нашему мнению, тремя главными факторами.

1. Методы упаковки *in vitro* позволяют вводить геном фага в бактерию с эффективностью 1%, т. е. намного эффективнее, чем при трансформации плазмидами.

2. Так как нерекомбинантные (т. е. лигировавшиеся на себя) молекулы вектора можно устранить из библиотеки селекцией на штамме NM514 (дефектном по рестрикции производном *ROPlyc7* [7]) или эквивалентном ему *HflA*, (гл. 2), нет необходимости дефосфорилировать вектор. Лигирование вектора с двухцепочечной ДНК можно проводить при избытке молекул вектора. Это позволяет присоединить с двух концов плечи вектора (что необходимо для упаковки *in vitro*) к большинству молекул кДНК. Детальное описание этих векторов можно найти в работе [8] и гл. 2 этой книги.

3. Описанный здесь метод позволяет получать кДНК с довольно большим выходом. Выход продукта при синтезе второй цепи обычно составляет 100%. Кроме того, отсутствуют потери, связанные с обработкой нуклеазой S1. С помощью этой методики получают кДНК, пригодные и для клонирования в «экспрессирующих» векторах на основе фага (см. гл. 2) или плазмид [9, 10]; скрининг таких библиотек можно вести при помощи антител. В этих случаях, однако, вектор обычно дефосфорилируют, что позволяет уменьшить загрязнение библиотеки нерекомбинантными молекулами.

2. Синтез кДНК

Изложенные в этом разделе методики можно использовать вместо тех, которые приведены в разд. 2.5.1—2.5.8 предыдущей главы. Методические тонкости, о которых шла речь в тех разделах, в равной степени относятся к настоящим методикам. Особенно важно использовать для всех реакций силиконированные приборки. Процедура силиконирования заключается в том, что стакан с пробирками помещают в вакуумный эксикатор вместе со стаканом, наполненным силиконизирующим реагентом, и выдерживают в условиях вакуума несколько часов. Авторы используют диметилдихлорсилан, поставляемый фирмой BDH в виде 2%-ного раствора в 1,1,1-трихлорэтаноле. Затем пробирки следует промыть стерильной дистиллированной водой и проавтоклавить.

2.1. Синтез первой цепи кДНК

Качество продукта синтеза первой цепи зависит от нескольких факторов; некоторые из них обсуждались в гл. 2. Важным условием для получения высококачественных библиотек кДНК является интактность мРНК. Как показано с помощью блот-гибридизационного анализа РНК с использованием зондов, предназначенных для скрининга библиотеки или зондов на основе имеющихся во многих организмах консервативных последовательностей ДНК (таких, как гены рибосомных белков, актина, тубулина или гистонов), хорошие результаты при выделении мРНК дает метод с использованием гуанидинтиоцианата [11, 12].

Протокол реакции синтеза первой цепи приведен в табл. 1. Условия реакции очень близки к описанным в гл. 2. Добавление ингибитора рибонуклеазы РНКазина позволяет значительно увеличить длину синтезированной первой цепи. РНКазин из печени или плаценты млекопитающих производится несколькими фирмами.

После этой стадии и стадии синтеза второй цепи следует определить включение в нуклеиновую кислоту радиоактивно меченного нуклеотида. Это можно сделать, если немедленно после добавления всех компонентов реакции, но до начала инкубации нанести две пробы по 2 мкл реакционной смеси на круглые фильтры из бумаги Whatman DE81. По одному из этих фильтров определяют общее количество внесенной радиоактивной метки, а по второму — включение в «нулевой» момент времени. После проведения реакции синтеза кДНК в течение 2 ч при 42°C (стадия 3, табл. 1) отбираются на бумагу DE81 еще 2 мкл реакционной смеси для того, чтобы определить включение в «нерастворимую» ДНК. Два фильтра, предназначенные для определения «нулевого» включения и включения через 2 ч реакции, промывают следующим образом:

1. 5 раз по 5 мин в 0,5 М Na_2HPO_4 .
2. 2 раза по 1 мин в воде.
3. 2 раза по 1 мин в 100%-ном этаноле.

Для промывки фильтры помещают в стакан, содержащий примерно 25 мл промывочной жидкости, и перемешивают в нем. Количество [^{32}P]-нуклеотида, включенного в одноцепочечную кДНК, определяют по радиоактивности фильтров с использованием сцинтиллятора и ^{32}P -канала сцинтилляционного счетчика. Обычно получаемый нами выход продукта синтеза первой цепи составляет 10—50% по весу. Истинный выход к ДНК, по всей видимости, несколько выше, так как использованная нами $\text{poly(A)} + \text{РНК}$ была очищена на oligo(dT) -целлюлозе только один раз, и чистота ее составляла 30—50%.

Таблица 1. Синтез первой цепи кДНК

1. Для реакционной смеси объемом 100 мкл прогрейте 10 мкг полиаденилированной РНК в 10 мкл воды 5 мин при 65 °С. Охладите пробирку во льду и перенесите РНК в другую пробирку, содержащую 5 мкл исходного раствора актиномицина D¹⁾, предварительно выдержанную для испарения растворителя в открытом виде на воздухе.

2. Добавьте 20 мкл пятикратного буфера для обратной транскриптазы²⁾, 20 мкл пятикратного d(ACGT)TP³⁾, 10 мкл раствора oligo(dT)₁₂₋₁₈ (200 мкг/мл, фирма Collaborative Research), 1 мкл 1 М ДТТ⁴⁾, 60 ед. РНКазина⁵⁾, 100 ед. обратной транскриптазы⁶⁾, 10 мкКи α³²P]dGTP⁷⁾ и воду до 100 мкл.

3. Отберите две аликвоты по 2 мкл для определения общей радиоактивности и «нулевого» включения (как описано в тексте) и проинкубируйте пробирку 2 ч при 42 °С.

4. Отберите аликвоту (2 мкл) для определения включенной в ДНК радиоактивности и добавьте 5 мкл 0,5 М ЭДТА pH 8,0; 2,5 мкл 10% SDS; 50 мкл фенола (уравновешенного 100 мМ трис-HCl pH 7,4) и 50 мкл хлороформа. Перемешайте до образования эмульсии и разделите фазы центрифугированием в микроцентрифуге. Экстрагируйте органическую фазу еще раз 50 мкл ТЕ⁸⁾. Объедините водные фазы и экстрагируйте их эфиром.

5. К водной фазе добавьте 100 мкл 4М ацетата аммония (пропущенного через нитроцеллюлозный фильтр) и 400 мкл 95%-ного этанола, смешайте и поместите на 15 мин в смесь сухого льда с этанолом.

6. Осадите нуклеиновую кислоту в микроцентрифуге. Тщательно удалите надосадов и растворите осадок в 50 мкл ТЕ. Добавьте 50 мкл 4М ацетата аммония, 200 мкл 95%-ного этанола.

7. Смешайте, охладите и отцентрифугируйте, как описано выше (стадии 5 и 6). Удалите надосадов и высушите осадок в вакууме. Растворите в 30 мкл ТЕ.

8. Отберите аликвоту (2 мкл) для определения длины кДНК гель-электрофорезом.

¹⁾ Актиномицин D (Calbiochem) растворите в 80%-ном этаноле в концентрации 800 мкг/мл.

²⁾ Пятикратный буфер для обратной транскрипции содержит 250 мМ трис-HCl pH 8,3 (42 °С), 40 мМ MgCl₂, 250 мМ KCl.

³⁾ Пятикратный d(ACGT)TP — это раствор, содержащий каждый из дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (PL) в концентрации 5 мМ. Мы готовим растворы каждого из трифосфатов в концентрации 20 мМ в 10 мМ трис-HCl pH 7,5.

⁴⁾ 1 М раствор ДТТ перед употреблением фильтруют через нитроцеллюлозную мембрану.

⁵⁾ РНКазин (фирмы Biotect) в концентрации 30 ед/мкл. Одна единица ингибирует на 50% активность 5 нг РНКазы А.

⁶⁾ Авторами с успехом используется обратная транскриптаза вируса миелобластопа птиц, предоставленная Дж. Бердом. Одна единица обратной транскриптазы включает 1 нмоль dTMP в кислотонерастворимый продукт за 10 мин при 37 °С.

⁷⁾ Удельная активность α³²P]dGTP (Amersham) составляет 410 Ки/ммоль.

⁸⁾ ТЕ содержит 10 мМ трис-HCl pH 8,0; 1 мМ ЭДТА.

2.2. Синтез второй цепи кДНК

Размер получаемой по приведенному здесь методу двухцепочечной кДНК должен совпадать с размером матрицы (первой цепи кДНК) при электрофоретическом фракционировании в щелочном агарозном геле. В этом состоит основное отличие описываемого метода от приведенного в предыдущей главе, где длина денатурированной двухцепочечной кДНК примерно вдвое больше длины матрицы из-за соединяющей две цепи шпильч-

ной структуры. При описанных ниже условиях вторая цепь должна получаться примерно в 10 раз «горячее», чем первая, так как при ее синтезе используется примерно в 10 раз меньшая концентрация немеченых нуклеотидов при той же концентрации метки. Таким образом, количество полученного на этой стадии радиоактивного продукта (двухцепочечной кДНК) будет отражать количество синтезированной второй цепи (рис. 1). Выход второй цепи кДНК составляет 100 ± 20%, причем отклонения связаны в первую очередь с ошибкой определения количества включенной метки.

Условия реакции суммированы в табл. 2. Сама реакция значительно отличается от аналогичной реакции, описанной в гл. 2, — в ней для частичной дегградации РНК в дуплексе РНК—ДНК применяется РНКазы Н. Получающиеся в результате олигорибонуклеотиды служат затравками для синтеза второй цепи. Кроме того, отсутствует стадия обработки нуклеазой S1. Длину кДНК, образующейся в реакциях синтеза первой и

Таблица 2. Синтез второй цепи кДНК

1. К 28 мкл продукта синтеза первой цепи кДНК добавьте 25 мкл четырехкратного буфера для ДНК-полимеразы¹⁾; 2,5 мкл пятикратного d(ACGT)TP²⁾; 1,0 мкл 15 мМ β-NAD (Sigma); 10 мкКи [α³²P]dGTP. Добавьте 5 ед. ДНК-лигазы³⁾, 30 ед. ДНК-полимеразы I *E. coli*⁴⁾ и 1 ед. РНКазы Н⁵⁾ на 1 мкл кДНК. Добавьте такое количество воды, чтобы конечный объем реакции составил 100 мкл.

2. Отберите две аликвоты по 2 мкл для определения общей внесенной радиоактивности и «нулевого» включения, как описано в разд. 2.1. Проинкубируйте смесь 1 ч при 14 °С, затем 1 ч при комнатной температуре.

3. Отберите аликвоту (2 мкл) для определения включенной в ДНК радиоактивности и добавьте 5 мкл 0,5 М ЭДТА pH 8,0, 2 мкл 10%-ного SDS, 50 мкл фенола (уравновешенного 100 мМ трис-HCl pH 8,0) и 50 мкл хлороформа. Встряхните пробирку для образования эмульсии и отцентрифугируйте 1 мин на микроцентрифуге. Экстрагируйте органическую фазу еще раз 50 мкл ТЕ.

4. К объединенным водным фазам добавьте 150 мкл 4 М ацетата аммония и 600 мкл этанола. Охладите до -70 °С в смеси сухого льда с этанолом. Далее следуйте указаниям пунктов 6 и 7 табл. 1. кДНК можно также осадить, добавив 1/10 объема 3 М ацетата натрия (профильтрованного через нитроцеллюлозный фильтр) и 2 объема этанола. Выход кДНК в этом случае может оказаться выше.

¹⁾ Для получения 1 мл четырехкратного буфера для ДНК-полимеразы смешайте 400 мкл 1 М NEPES pH 7,6; 16 мкл 1 М MgCl₂; 4,4 мкл 2-меркаптоэтанола; 270 мкл 1 М KCl и 310 мкл воды.

²⁾ Состав d(ACGT)TP приведен в примечании к табл. 1.

³⁾ 1 единица ДНК-лигазы *E. coli* — это количество фермента, достаточное для 50%-ного лигирования расщепленной *Hind*III ДНК фага λ за 30 мин при 16 °С в объеме 20 мкл и при концентрации 5'-концов 0,12 мМ (~330 мкг/мл). Авторы используют лигазу фирмы New England Biolabs.

⁴⁾ 1 единица ДНК-полимеразы *E. coli* — это количество фермента, необходимое для включения 10 нмоль дезоксирибонуклеотидов в кислотонерастворимую фракцию за 30 мин при 37 °С. Авторы используют фермент фирмы New England Biolabs.

⁵⁾ 1 ед. РНКазы Н гидролизует 1 нМ [α³²H]polyA в составе [α³²H]poly(A): poly(dT) за 20 мин при 37 °С. Авторы используют РНКазу Н фирмы Bethesda Research Laboratories.

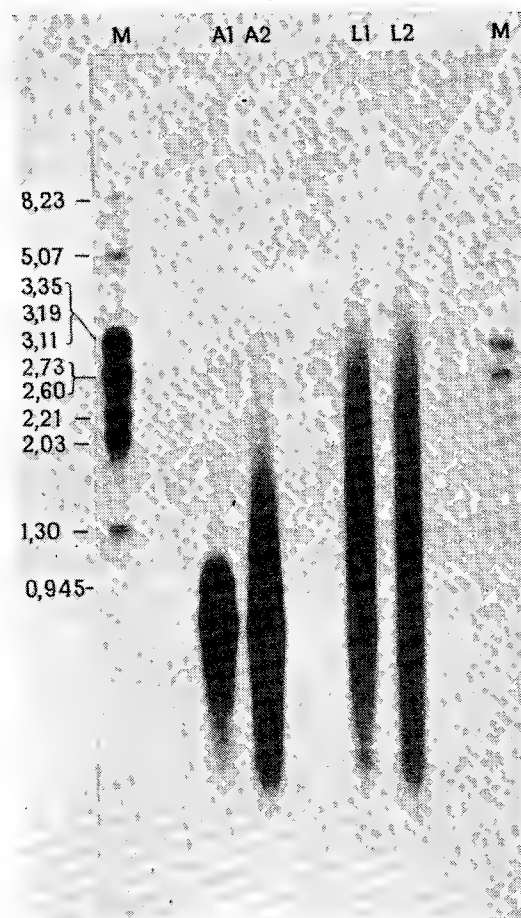


Рис. 1. Аликвоты, взятые из реакций синтеза первой и второй цепей (по 5000 имп/мин), после добавления 2 мкг ДНК-носителя осаждали этанолом, высушивали и растворяли в 20 мкл буфера для щелочного гель-электрофореза (30 мМ NaOH, 1 мМ ЭДТА). После добавления смеси глицерина и бромкрезолового зеленого образцы фракционировали в 1,2%-ном щелочном агарозном геле в том же буфере в течение 3 ч при 150 В (с рециркуляцией буфера), отпечатавали на бумаге Whatman DE81, высушивали и радиоавтографировали. А — кДНК атриальной железы *Aplysia*; L — кДНК гипоталамуса обезьяны. Цифры 1 и 2 обозначают реакции синтеза первой и второй цепей. Как упомянуто в тексте, количество метки, включаемой при синтезе второй цепи, служит количественной характеристикой этой реакции; М — дорожка стандартов длины, содержащая 5000 имп/мин расщепленной *Hind*III ДНК Ad2, меченной по концам киназой. Две выделяющиеся на фоне гетерогенных продуктов реакции в дорожке А1 полосы соответствуют ДНК-транскриптам двух мРНК, кодирующих богато представленные предшественники нейропептидов, называемые А и В [16]. Качество продукта синтеза второй цепи наглядно выявляется при сравнении дорожек А1 и А2.

второй цепей, можно определить при помощи электрофореза в щелочном агарозном геле, как описано в разд. 2.5.3 гл. 2. ДНК можно перенести из геля на лист бумаги DE81 так же, как при ускоренном переносе по Саузерну. Положите гель на кусок поливинилхлоридной пленки, наложите сверху лист бумаги DE81, затем стопку фильтровальной бумаги, стеклянную пластинку и груз. Через 2 ч бумагу DE81 снимите, высушите в сушилке для гелей и радиоавтографируйте. Нейтрализовать гель необязательно.

2.3. Подготовка двухцепочечной кДНК к лигированию с вектором

Приведенные методики, аналогичные описанным в предыдущей главе и подробно изложенные в табл. 3, включают в себя:

Таблица 3. Подготовка кДНК к лигированию с вектором

А. Реакция достройки концов

1. Ресуспендируйте кДНК в 25 мкл раствора, полученного на последней стадии табл. 2. Добавьте 1 мкл пятикратного d (ACGT)TP¹⁾, 1 мкл раствора бычьего сывороточного альбумина (BSA — от англ. *bovine serum albumin*) (2 мг/мл, фирмы Pentex, свободный от нуклеаз), 9 единиц ДНК-полимеразы T4²⁾ и 3 мкл десятикратного буфера для полимеразы T4³⁾. Конечный объем реакции 30 мкл.

2. Проинкубируйте 30 мин при 37 °С и добавьте 30 мкл фенола и 30 мкл хлороформа. Встряхните и отцентрифугируйте для разделения фаз. Экстрагируйте фенольную фазу дополнительно 30 мкл ТЕ.

3. Экстрагируйте эфиром и осадите ДНК этанолом, как описано в табл. 1 (стадия 3). Ресуспендируйте полученный осадок в 4,8 мкл воды.

Б. Метилирование *Eco*RI-сайтов

1. К ресуспендированной в 4,8 мкл H₂O кДНК добавьте 1 мкл раствора SAM⁴⁾ (1 мкКи), 2 мкл пятикратного буфера для метилазы⁵⁾, 2 мкл раствора BSA (2 мг/мл), 0,2 мкл метилазы *Eco*RI (26 ед.⁶⁾/мкл).

2. Проинкубируйте 20 мин при 37 °С. Экстрагируйте смесью фенол/хлороформ, повторно экстрагируйте органическую фазу, объедините водные фазы, экстрагируйте их эфиром и осадите этанолом (см. стадии 4—8 табл. 1).

3. Соберите осадок центрифугированием, слейте надосадок и высушите осадок в вакууме.

В. Присоединение линкеров к кДНК

1. Ресуспендируйте осадок в 5 мкл однократного буфера для киназы⁷⁾, 5 мкл фосфорилированных линкеров (500 нг)⁸⁾ и 0,2 мкл раствора АТФ (22 мМ).

2. Добавьте 0,5 мкл ДНК-лигазы T4 (400 ед.⁹⁾/мкл) и проинкубируйте ночь при 14 °С.

Г. Расщепление присоединенных к кДНК линкеров и удаление их избытка

1. Прогреейте реакционную смесь для лигирования 10 мин при 65 °С. Отцентрифугируйте несколько секунд для осаждения каплей конденсата. Добавьте 1,5 мкл 1 М трис-HCl pH 7,5; 1 мкл 1 М NaCl (профильтрованного через нитроцеллюлозный фильтр) и 5,6 мкл воды.

2. Добавьте 140 единиц¹⁰⁾ *Eco*RI и проинкубируйте 2 ч при 37 °С.

Продолжение

3. Добавьте 30 мкл ТЕ и экстрагируйте смесью фенол/хлороформ. Экстрагируйте органическую фазу еще дважды 50 мкл ТЕ. Водную фазу экстрагируйте трижды эфиром, внесите 15 мкл 2М ацетата натрия и 450 мкл этанола. Охладите до -70°C и осадите ДНК в микроцентрифуге. Удалите надосадок и высушите осадок в вакууме.

4. Растворите осадок в 20 мкл 0,4 М NaCl; 10 мМ трис-HCl pH 8,0; 1 мМ ЭДТА (STE) и 2 мкл глицерина с бромфеноловым синим. Отделите кДНК от избытка линкеров путем гель-фильтрации на колонке с Ultrogel AcA34 (LKB) объемом 1 мл. Колонку, изготовьте из оттянутой и силиконированной пастеровской пипетки, в которую поместите пробку из силиконированной стекловаты. Колонку уравновесьте буфером STE. Проведите элюцию тем же буфером, собирая фракции по 100 мкл. Определите радиоактивность фракций и соберите материал, соответствующий пику кДНК¹¹⁾.

¹⁾ Состав пятикратного d(ACGT)TP описан в примечании 3 к табл. 1.

²⁾ 1 единица ДНК-полимеразы T4 катализирует включение 10 нмоль нуклеотидов в кислотонерастворимый продукт за 30 мин при 37°C . Авторы пользуются ферментом фирмы PL Biochemicals.

³⁾ Десятикратный буфер для полимеразы T4 содержит 330 мМ трис-ацетата pH 7,9; 660 мМ ацетата калия; 100 мМ ацетата магния; 1 мг/мл BSA (фирма Pentex, свободный от нуклеаз); 5 мМ ДТТ.

⁴⁾ SAM — S-аденозил-L-[метил- ^3H]метионин фирмы Amersham (удельная активность 15 Ки/ммоль). SAM, поставляемый другими фирмами, часто бывает загрязнен S-аденозилгомоцистеином, который ингибирует метилазу.

⁵⁾ Пятикратный буфер для метилазы содержит 500 мМ трис-HCl pH 8,0; 5 мМ ЭДТА pH 8,0.

⁶⁾ 1 ед. метилазы *EcoRI* — это количество фермента, необходимое для защиты от расщепления рестриктазой *EcoRI* 1 мкг ДНК фага λ за 1 ч при 37°C и объеме реакционной смеси 10 мкл. Авторы используют фермент фирмы New England Biolabs.

⁷⁾ Состав буфера для киназы приведен в тексте разд. 2.3.

⁸⁾ Фосфорилирование линкеров описано в тексте разд. 2.3.

⁹⁾ 1 ед. ДНК-лигазы T4 — это количество фермента, необходимое для 50%-ного лигирования расщепленной *HindIII* ДНК фага λ за 30 мин при 16°C в объеме 20 мкл при концентрации концов 0,12 мМ (~330 мкг/мл). Авторы используют фермент фирмы New England Biolabs.

¹⁰⁾ 1 ед. *EcoRI* — это количество фермента, необходимое для расщепления 1 мкг ДНК фага λ за 1 час при 37°C в соответствующем буфере. Авторы используют высококонцентрированный фермент фирмы Boehringer.

¹¹⁾ Подробная методика гель-фильтрации приведена также в разд. 2.5.8 предыдущей главы.

1) достройку всех незавершенных концов кДНК для того, чтобы к ним можно было присоединить химически синтезированные линкеры и образовать на концах молекул участки расщепления *EcoRI*;

2) защиту внутренних *EcoRI*-сайтов от расщепления ферментом с помощью модификации метилазой *EcoRI*;

3) присоединение к кДНК линкеров;

4) обработку *EcoRI* для удаления избытка линкеров, образовавшихся при лигировании олигомеры, и для формирования у молекул кДНК липких *EcoRI*-концов.

Перед присоединением к кДНК линкеры метят радиоактивными изотопами. Реакцию проводят в объеме 50 мкл с помощью полинуклеотидкиназы T4, как описано ниже.

1. Приготовьте реакционную смесь (50 мкл), содержащую 5 мкл дефосфорилированных *EcoRI*-линкеров (5 мкг), 5 мкл свежеприготовленного десятикратного буфера для киназы (100 мМ трис-HCl pH 7,5; 100 мМ MgCl_2 ; 100 мМ ДТТ; 10 мМ

АТР), 36 мкл воды, 1 мкл [$\gamma\text{-}^{32}\text{P}$] АТР с высокой удельной активностью (10 мкКи) и 3 мкл полинуклеотидкиназы T4 (15 единиц, фирма Boehringer). 1 единица фермента катализирует включение 1 нмоля ^{32}P в кислотонерастворимый продукт за 30 мин при 37°C .

2. Проинкубируйте 1 ч при 37°C , разделите на аликвоты по 5 мкл и заморозьте при -20°C .

Реакцию фосфорилирования концов следует проконтролировать. Для этого лигируйте аликвоту раствора линкеров и обработайте часть этой аликвоты рестриктазой *EcoRI*. Продукты проанализируйте с помощью электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле, как описано в разделе 2.5.6 гл. 2, либо электрофорезом в 6%-ном геле для определения нуклеотидной последовательности ДНК (6% акриламида, 7 М мочевины). В последнем случае электрофорез следует вести до тех пор, пока краситель бромфеноловый синий не достигнет середины геля. В результате лигирования линкеры должны образовать «лестницу» из сшитых олигомеров разной длины. После обработки *EcoRI* все олигомеры должны расщепиться до мономеров. Не забудьте перед рестрикцией инактивировать лигазу, прогрев реакционную смесь в течение 5 мин при 70°C .

2.4. Лигирование кДНК с векторной ДНК

Расщепление ДНК инсерционного λ -вектора рестриктазой *EcoRI* и лигирование его с кДНК описаны в табл. 4.

3. Упаковка in vitro и рассев гибридных фагов

Рекомбинантная ДНК после стадии 2 таблицы 4 готова для упаковки в частицы фага in vitro. В этой главе мы не рассматриваем эти методики, так как упаковка in vitro описана в работе [13], а рассев содержащих кДНК рекомбинантных фагов описывается в предыдущей главе, начиная с разд. 2.5.12.

4. Заключительные замечания

При выборе системы вектор — хозяин для клонирования кДНК необходимо учесть несколько факторов. Действие системы рекомбинации как хозяина, так и вектора, может приводить к перестройкам последовательностей и при первичном расसेве, и при амплификации. Клетки *hfl* имеют генотип *recA*⁺, а $\lambda\text{gt}10$ и $\lambda\text{gt}11$ — *red*⁺. Для того чтобы избежать нестабильности, наблюдающейся, например, при клонировании в *red*⁺-векторах ($\lambda\text{gt}11$) кДНК-копий мРНК, содержащих короткие тандемно повторяющиеся последовательности, можно использовать вектор *red*⁻ (Дж. Скейф, личное сообщение, и [14]).

Таблица 4. Лигирование кДНК и векторной ДНК

А. Расщепление ДНК инсерционного λ -вектора

1. Расщепите около 50 мкг ДНК вектора с помощью 6 мкл *EcoRI* (140 ед./мкл) в течение 2—3 ч при 37 °С; объем реакционной смеси 300 мкл.
2. Экстрагируйте смесью фенола с хлороформом, затем экстрагируйте органическую фазу и осадите ДНК этанолом, как описано в табл. 1 (стадии 4—8), но при комнатной температуре.
3. Соберите ДНК центрифугированием, удалите надосады, осадок высушите и растворите в 50 мкл ТЕ.

Б. Лигирование вектора и кДНК

1. Молярное соотношение вектора и кДНК должно быть около 2:1, т. е. приблизительно 5 мкг ДНК плеч вектора должно приходиться на 100 нг кДНК (считая, что средний размер кДНК составляет 2000 п.н.). Большие соотношения также допустимы. В идеале концентрация ДНК при лигировании должна быть не менее 1 мг/мл.

Соосадите кДНК и плечи вектора этанолом. Охладите в смеси сухого льда с изопропанолом и соберите ДНК центрифугированием. Удалите надосады, высушите осадок и растворите его в 3,5 мкл воды. Добавьте 0,5 мкл десятикратного буфера для лигирования²⁾; 0,5 мкл 10 мМ АТР и 0,5 мкл (200 ед.) ДНК-лигазы Т4. Так как работать с большими объемами легче, можно проводить реакцию в двойном масштабе, т. е. использовать 10 мкг ДНК плеч вектора и 200 нг кДНК. Инкубируйте смесь в течение ночи при 14 °С.

2. Разбавьте реакционную смесь ТЕ до 50 мкл и прогрейте 5 мин при 65 °С. ДНК готова для упаковки.

¹⁾ Десятикратный буфер для *EcoRI* содержит 1 М трис-НСl pH 7,2; 500 мМ NaCl, 50 мМ MgCl₂; 20 мМ 2-меркаптоэтанол.

²⁾ Десятикратный буфер для лигирования содержит 600 мМ трис-НСl pH 7,5; 100 мМ MgCl₂; 100 мМ 2-меркаптоэтанол; 10 мМ ЭДТА и 1 мМ АТР.

Полезным может оказаться применение *red*⁻-векторов NM641 [8], NM1150 [4] и даже хозяина *recA*⁻, такого, как NM553 (*hfl*⁻ г⁺ m⁺; Н. Мюррей, личное сообщение). Кроме того, описаны перестройки последовательностей, явно относящиеся к артефактам, связанным с обратной транскрипцией [15].

Как подробно обсуждалось в гл. 2, вектор λ gt10 сконструирован специально для клонирования эукариотических мРНК средних размеров. При клонировании вставок большого размера (>5 т.п.н.) следует использовать другие векторы, способные включать большие фрагменты, например NM1149 или его *red*⁻-производное, NM1150.

Нередко первый клон, выделенный из библиотеки при скрининге, представляет собой лишь часть мРНК (что видно при сравнении его длины с длиной соответствующей мРНК, определенной путем переноса на нитроцеллюлозу). Более длинные клоны обычно получают при повторном скрининге библиотеки зондом, полученным на основе короткого клона. К сожалению, при этом может произойти отбор клонов, содержащих посторонние (не относящиеся к мРНК) последовательности, захваченные в ходе присоединения линкеров (число таких последо-

вательностей можно уменьшить, используя при лигировании большие избытки линкеров) или при лигировании вектора с кДНК (при этом неизбежно, хотя и в небольшом количестве, появляются двойные вставки). Если клон кДНК при Нозерн-блоттинге гибридизуется со многими мРНК (особенно если этот клон содержит *EcoRI*-сайты), то к нему следует относиться с осторожностью. Во всех случаях, когда это возможно, следует выяснить, совпадают ли рестриктивные карты для независимо выделенных клонов. Необходимо определить 5'-концевую последовательность мРНК либо проверить ее, используя в качестве затравки при достройке цепи (при достаточном количестве РНК) или сравнивая ее с последовательностью геномного клона.

Благодарности

Мы благодарим Хирото Окаяму и Пола Берга (Станфорд), сообщивших нам до публикации условия синтеза второй цепи. В разработке методики участвовали сотрудники лаборатории Ричарда Акселя (Майкл Палазоло, Скотт Цейтлин, Тони Клаудио, Грег Лемке). Мы благодарны Барбаре Уолд (Калтех), Риду Янгу (Станфорд) и Норину Мюррею (Эдинбург) за помощь и предоставленные нам штаммы.

Литература

1. Okayama H., Berg P. *Mol. Cell Biol.*, **2**, 161 (1982).
2. Efstratiadis A., Kafatos F. C., Maxam A. M., Maniatis T. *Cell*, **7**, 279 (1976).
3. Gubler U., Hoffman B. J. *Gene*, **25**, 263 (1983).
4. Murray N. E. In: *Lambda II*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1983.
5. Williams B. G., Blattner F. R. In: *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Setlow J. K. and Hollaender A. (eds.), New York, Plenum, 1980.
6. Scherer G., Telford I., Baldari C., Pirrotta V. *Dev. Biol.*, **86**, 438 (1981).
7. Lathe R., Lecocq J.-P. *Virology*, **83**, 204 (1977).
8. Murray N. E., Brammar W. J., Murray K. *Mol. Gen. Genet.*, **150**, 53 (1977).
9. Stanley K. R., Luzio J. B. *EMBO J.*, **3**, 1429 (1984).
10. Ruther U., Muller-Hill B. *EMBO J.*, **2**, 1791 (1983).
11. Chirgwin J. M., Przybyla A. E., Macdonald R. J., Rutter W. J. *Biochemistry*, **18**, 5294 (1979).
12. Cathala G., Savouret J.-F., Mendez B., West B. L., Karin M., Martial J. A., Baxter J. D. *DNA*, **2**, 329 (1983).
13. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1982. [Имеется русский перевод: Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984.]
14. Hall R., Hyde J. E., Goman M., Simmons D. L., Hope I. A., Mackay M., Scaife J., Merkli B., Riehle R., Stocker J. *Nature*, **311**, 379 (1984).
15. O'Hare K., Breathnach R., Benoist C., Chambon P. *Nucleic Acids Res.*, **7**, 321 (1979).
16. Scheller R. H., Jackson J. F., McAllister L. B., Rothman B. S., Mayeri E., Axel R. *Cell*, **32**, 7—22 (1982).

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ ХИМЕРНЫХ β -ГАЛАКТОЗИДАЗ, ЭКСПРЕССИРУЕМЫХ ПЛАЗМИДНЫМИ ВЕКТОРАМИ

Михель Кёнен, Ганс-Вернер Гриссер и Бенно Мюллер-Хилл

1. Введение

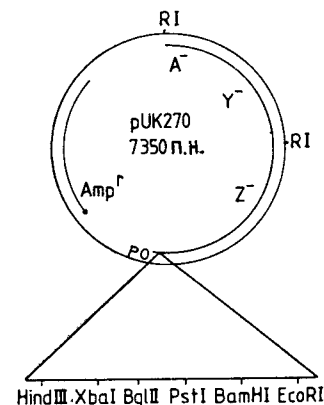
В последние годы были сконструированы различные экспрессирующие векторы, использующиеся для клонирования геномной ДНК прокариот или кДНК эукариот. Появление таких векторов дало возможность идентифицировать клонированные ДНК, выявляя детерминируемые ими белки. Некоторые из экспрессирующих векторов содержат только необходимый для транскрипции промотор и необходимые для трансляции последовательность Шайна — Далгарно и иницирующий кодон. В состав других векторов входит ген-носитель, в который и вводится чужеродная ДНК.

С того времени, как нами впервые были описаны активные химеры β -галактозидазы [1], разработано много систем клонирования, использующих тот факт, что 25 N-концевых остатков β -галактозидазы можно без нарушения ее активности заменить полипептидом любого размера и происхождения [2—11]. В этой главе мы опишем векторы такого типа, разработанные в нашей лаборатории. Наши векторы позволяют клонировать чужеродную ДНК как в 5'-, так и в 3'-концевой области гена *lac Z* [5, 12]. Клонированную ДНК можно экспрессировать в виде химерной β -галактозидазы. Клонирование ДНК в 5'-концевой области гена *lac Z* приводит к появлению продуктов слияния, в которых вставка кодирует N-концевую область активной β -галактозидазы. В результате клонирования в 3'-концевой зоне гена *lac Z* появляется такой продукт, в котором вставкой кодируется C-концевая область активной β -галактозидазы. ДНК с известной последовательностью можно вставить непосредственно в виде рестриктивного фрагмента в соответствующую рамку считывания гена *lac Z*. Если последовательность ДНК неизвестна, ее можно клонировать при помощи достроенных dG/dC-концов. В этом случае лишь некоторая часть рекомбинантов будет сформирована с соблюдением рамки считывания и требуемой ориентации вставки. Мы обнаружили, что при подходящих условиях большая часть (хотя и не все) химерных β -галактозидаз стабильна на 90%. В дальнейшем мы объясним, почему применение β -галактозидазы в качестве фермента-носителя дает возможность выделять и очищать все химерные

антигены одним и тем же методом. При использовании этого фермента выявление нужных клонов можно проводить, анализируя их β -галактозидазную активность [5, 6].

2. Клонирование в 5'-концевой области гена *lac Z*

Плазмида pUK270 (рис. 1) содержит полный *lac*-оперон: ген *lac Z* с мутацией сдвига рамки в полилинкере, находящемся в проксимальной части промотора, ген *lac Y* и часть гена *lac A*. Бактерии, несущие pUK270, не могут расти на чашках с минимальным агаром и лактозой, если у них делетирован хромосомный *lac*-оперон. Используемый нами в качестве хозяина штамм F11 *rec A* имеет делецию (*lac pro*) и содержит эписому F' *lac pro*. Эписома экспрессирует *lac*-репрессор с промотора I^q и несет делецию всего гена *lac Z*. В то же время она активна по



ACG

ACG CCA AGC TTT CTA GAG ATC TTC CAT ACC TAC CAG TTC TGC
Hind III Xba I Bgl II

GCC TGC AGC AAT GGC AAG AAC GTT GCC CGG ATC CGG GGA ATT CA
Pst I Bam HI Eco RI

Фрагмент Hind III/Eco RI : 74 п.н.

Фрагмент Hind III/Pst I : 43 п.н.

Фрагмент Pst I/Eco RI : 31 п.н.

Рис. 1. Плазмида pUK270 содержит ген *lac Z*, ген *lac Y* и часть гена *lac A*. Мутация со сдвигом рамки в области полилинкера превращает плазмиду в *lac Z*-

lac-пермеазе. Следует подчеркнуть, что этот штамм нельзя заменить каким-либо другим, хорошо трансформирующимся. Штамм, используемый в качестве хозяина, должен быть сверх-продуcentом *lac*-репрессора для того, чтобы плазмидные гены *lac Z* в отсутствие индукции находились в репрессированном состоянии. Присутствие больших количеств *lac*-репрессора препятствует полной экспрессии плазмидных генов *lac Z* даже при наличии лактозы или индуктора изопропил-1-тио- β -D-галактозида (IPTG). Это обуславливает стабильность *lac*-оперона плазмиды. Гиперэкспрессия β -галактозидазы неблагоприятна для роста клеток и приводит к накоплению мутантных плазмид, имеющих дефекты во вставке и *lac*-опероне. Колонии несущих плазмиду pUK270 клеток F11 *rec A* при росте на богатой среде, содержащей IPTG и гистохимический краситель 5-бromo-4-хлоро-3-индолил- β -D-галактозид (X-Gal), имеют бледно-голубую окраску, что свидетельствует о небольшой фоновой экспрессии β -галактозидазы. То же наблюдается и при использовании сходных векторов pUK230 и pUK250, сконструированных ранее [5, 13]. Причиной этой остаточной активности может быть функционирование слабого побочного промотора или супрессия мутации сдвига рамки. В любом случае эта активность не мешает работе с вектором. Плазмида pUK270 предназначена для клонирования ДНК с известной последовательностью в любом из шести рестрикционных сайтов полилинкера, но в основном для клонирования в участке Pst I случайных фрагментов ДНК с использованием достроенных dG/dC концов.

Рекомбинантные клоны можно отбирать по сбраживанию лактозы на содержащей ее минимальной среде либо на богатой среде с добавлением IPTG и X-Gal. Однако при прямом рассеиве трансформантов на минимальной среде с лактозой эффективность трансформации понижается примерно на порядок. Вот почему мы сначала рассеивали трансформанты на чашках с богатой средой, содержащей ампициллин, а затем отбирали *lac*-положительные трансформанты, перенося колонии на минимальную среду с лактозой. Можно также отбирать рекомбинанты на чашках с богатой средой, содержащей IPTG, X-Gal и ампициллин, по ярко-синему цвету колоний. При клонировании случайных фрагментов ДНК с присоединением dG/dC-концов число *lac*⁺-колоний составляет 5–10% от общего числа трансформантов. Фрагменты экзогенной ДНК способны отжигаться с векторной ДНК в двух ориентациях и шести возможных рамках считывания (рис. 2).

Половина образовавшихся клонов содержит вставку в не-правильной ориентации. Из клонов, содержащих вставку в нужной ориентации, только у 1/3 будет соблюдаться фаза по 5'-концу и лишь 1/3 из этих последних сохранит фазу и по 3'-концу. В предыдущих экспериментах мы наблюдали, что часто-

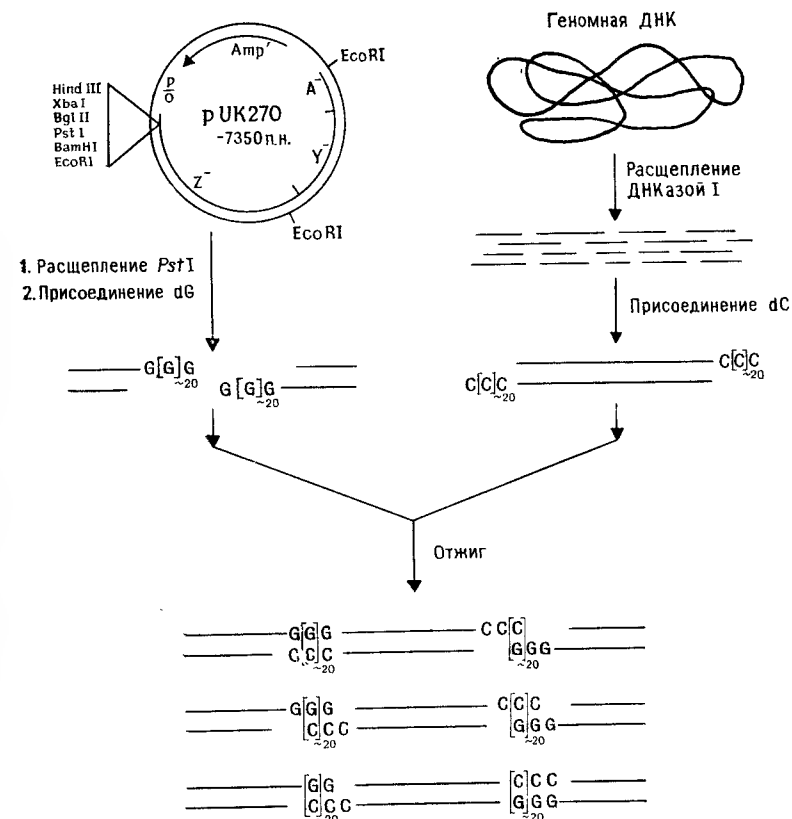


Рис. 2. Клонирование геномной ДНК в *PstI*-сайте плазмиды pUK270 после присоединения dG/dC-концов. Отжиг синтезированных гомополимерных участков как на 5'-, так и на 3'-концах вставки происходит случайным образом, что приводит к появлению плазмид со всеми возможными рамками считывания.

та появления *lac*⁺-колоний нередко превышает ожидаемые 5% [5, 6]. Это можно объяснить двумя способами. Во-первых, возможно, что ДНК-вставки содержат свои собственные иницирующие трансляцию кодоны. В пользу этого говорит высокая частота, с которой нам удавалось выделять 5'-конец гена *lac I*. Во-вторых, небольшие фрагменты ДНК могут содержать более одной открытой рамки считывания.

Полилинкер pUK270 позволяет определять нуклеотидную последовательность химическим методом, начиная с обоих концов вставки, клонированной в *PstI*- или *BglII*-сайте [14, 15]. В то же время, используя *HindIII*- и *EcoRI*-сайты полилинкера, вставку можно быстро переклонировать в векторы M13mp8 или mp9 [16] и определить ее последовательность ферментативным методом [17].

3. Клонирование в 3'-концевой области гена *lacZ*

Мы разработали также серию векторов, пригодных для клонирования ДНК в 3'-концевой области гена *lacZ* с образованием активных химерных β -галактозидаз [12]. Эти же векторы используют и для клонирования кДНК, если желаемым продуктом является активная химерная β -галактозидаза. Наличие на 3'-конце кДНК стоп-кодона делает обязательным использование этих векторов в тех случаях, когда необходимо добиться экспрессии химерных β -галактозидаз. кДНК-вставку из имеющегося клона можно переклонировать, используя *Pst*I-сайт или другие сайты рестрикции. Нами сконструированы векторы для всех трех трансляционных рамок считывания [12]. Эти векторы, естественно, пригодны и для получения библиотек кДНК. Объем таких библиотек ограничен только эффективностью, с которой плазмидная ДНК трансформирует *E. coli*.

Во всех случаях обязательно использование хозяина, продуцирующего *lac*-репрессор в количествах, достаточных для эффективного подавления синтеза β -галактозидазы. Мы используем в качестве хозяина уже описанный в разд. 2 штамм F11 *res* A. Обе системы клонирования можно приспособить для λ -векторов. Плазмида pUR290 (рис. 3), один из векторов с различными трансляционными рамками считывания, несет ген *lacZ* с его регуляторной областью. Непосредственно перед стоп-кодоном этого гена имеется полилинкер [12]. В противоположность pUK270 этот экспрессирующий вектор имеет генотип *lac* Z⁺. Колонии бактерий, несущих делецию хромосомного *lac*-оперона и содержащие эту плазмиду, окрашены в темносиний цвет при выращивании на богатой среде, содержащей IPTG и X-Gal. Между pUR290 и pUK270 существуют и другие небольшие различия. pUR290 не содержит гена *lacY* и непригодна для селекции *lac*⁺-рекомбинантов на агаре с лактозой на

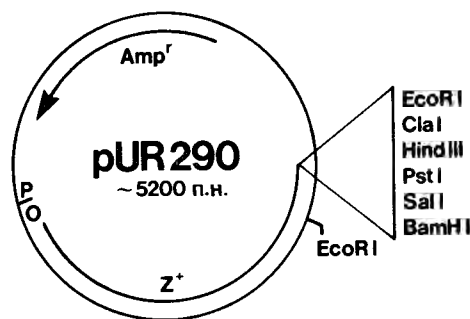


Рис. 3. Плазмида pUR290, несущая ген *lacZ* с полилинкером в его 3'-концевой области. Генотип плазмиды *lac* Z⁺.

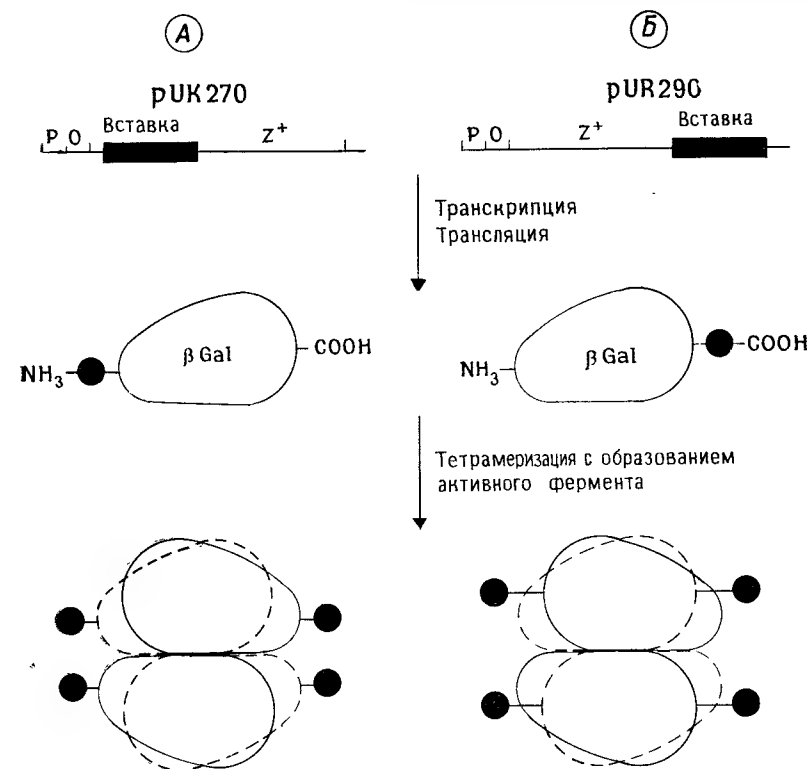


Рис. 4. А. pUK270 с фрагментом ДНК, клонированным в полилинкер на 5'-конце гена *lacZ*. Вставка кодирует N-концевую часть химерной β -галактозидазы. Химерный фермент активен в виде тетрамера. Б. pUR290 с фрагментом ДНК, клонированным в 3'-концевой зоне гена *lacZ*. Вставка кодирует C-концевую часть химерного белка.

фоне делеции *lacX* *Y*. Как указано в разд. 2, выход *lac*-рекомбинантов при клонировании случайных фрагментов ДНК с присоединением dG/dC-концов в pUK270 составляет 5—10%. Тот же метод при использовании плазмиды pUR290 дает максимально 17% рекомбинантов, так как для успешного клонирования в нужной рамке считывания и ориентации должен быть вставлен лишь 5'-конец экзогенного фрагмента. Селекция рекомбинантных клонов в данном случае невозможна, поскольку pUR290 так же, как и рекомбинант, *lac*-положительна. Клонирование ДНК в полилинкер pUR290 дает возможность производить определение нуклеотидной последовательности химическим методом с обоих концов [14, 15]. Наличие сайтов рестрикции для *Hind*III и *Bam*HI позволяет переклонировать вставку в M13mp8 или mp9 для ферментативного определения последовательности [16, 17].

4. Практические методики

4.1. Материалы

4.1.1. Пластины для иммобилизации антител

Мы используем для этой цели пластины из поливинилхлорида (ПВХ). Они производятся фирмой Fa. Beppeke Hannover-Vinnhorst. Торговое название материала — Beppecor, Acetella glasklar. Для защиты поверхности полимера от повреждений пластины с одной стороны должны быть покрыты тонким листом бумаги. Для того чтобы пластины можно было легко наложить на поверхность чашки с лизированными колониями бактерий, они (эти пластины) должны быть гибкими. Если материал излишне жесткий, то лизированные колонии будут подвергаться слишком большому давлению. Это приводит к размазыванию бактерий по всей пластине, на которой при этом появляется голубоватый фон. Старайтесь не прикасаться к той поверхности полимера, которая используется для связывания антител. Иногда на пластинах можно заметить небольшие серые образования; при промывках грязь с них не удаляется. К этим участкам белки прилипают неспецифически и при скрининге дают мощный положительный сигнал. Круглые пластины диаметром 8 см можно вырезать из больших листов с помощью циркуля. Для этого грифель в нем нужно заменить на режущую кромку скальпеля или бритвенного лезвия. Такой инструмент обрезает край очень ровно. При использовании других инструментов на обрезанном краю пластика часто остаются мелкие шероховатости, которые могут привести к появлению неспецифического окрашивания.

4.1.2. Реактивы

Буфер для связывания антител содержит 0,2 М NaHCO_3 , pH 9,2. Раствор для промывки включает 150 мМ NaCl , 10 мМ K-PO_4 , pH 7,2; 0,5 об. % Тритона X100; 0,5% бычьего сывороточного альбумина (BSA). Двукратный буфер TMSII содержит 20 мМ трис- HCl , pH 7,5; 20 мМ ацетата Mg; 400 мМ KCl ; 0,2 мМ ЭДТА; 100 мМ β -меркаптоэтанола. Использовали X-Gal и IPTG фирмы Bachem Inc. Бактериальные чашки готовили согласно [18], IgG — по [19].

4.2. Иммобилизация антител на пластинах

Пластины из ПВХ покрывают антителами в чистых стерильных стеклянных чашках Петри. В большинстве экспериментов использовали IgG, очищенный на ДЭАЭ-колонке. Дальнейшая очистка IgG, например на аффинной колонке с антигеном, не

проводилась. 5 мл буфера для связывания, содержащего 90 мкг/мл IgG, достаточно для того, чтобы покрыть 10 пластин. Процедуру проводите следующим образом.

1. Пометьте пластины фломастером и с помощью пинцета поместите их на поверхность раствора антител.

2. Оставьте пластины в контакте с раствором на 2 мин при комнатной температуре, осторожно покачивая чашку Петри.

3. С помощью пинцета достаньте пластину из раствора. Дайте избытку раствора антител стечь с пластины, затем поместите ее в раствор для промывки. Сосуд с раствором для промывки должен вмещать несколько пластин.

4. Промойте пластины 5 мин при комнатной температуре. Следите, чтобы пластины не соприкасались между собой, так как при этом их поверхность может потерять способность сорбировать антитела.

В ходе промывки пластины насыщаются избытком BSA, который блокирует все неспецифические центры связывания белка.

4.3. Лизис бактериальных колоний

В строгом смысле слова термин «лизис» неверен, так как при обработке колоний хлороформом разрушаются мембраны, но не клеточные стенки *E. coli*. На самом деле процедуры, приводящие к лизису клеточной стенки, например обработку лизоцимом, использовать нельзя, так как они могут привести к артефактам. Вот почему приходится прибегать к обработке хлороформом, хотя в этом случае лишь небольшое количество β -галактозидазы становится доступной для антител. Обработку колоний хлороформом можно проводить двумя способами.

1. Вырастите колонии на лактозном агаре при 37°C в стеклянных чашках Петри. Охладите чашки 1 ч в холодильнике, затем залейте колонии 5 мл хлороформа. Проинкубируйте колонии с хлороформом 2 мин при комнатной температуре, затем хлороформ слейте. Поместите чашки в термостат (37°C) на время, достаточное для испарения остатков хлороформа. Храните чашки при 4°C.

2. Вырастите до 1000 колоний на пластиковых чашках Петри с лактозным агаром. Накройте колонии на 2 мин нитроцеллюлозным фильтром (Schleicher and Schüll). Отметьте положение фильтра, промаркировав его иглой, а чашку — фломастером. Удалите фильтр с чашки пинцетом и перенесите его в свежую чашку с богатой средой. Проинкубируйте эту чашку 1 ч при 37°C. Данную процедуру можно повторить несколько раз, взяв несколько фильтров. Колонии на исходной (эталонной) чашке можно подрастить, поместив ее на ночь на 37°C. Эта методика [20] позволяет провести испытание одних и тех же

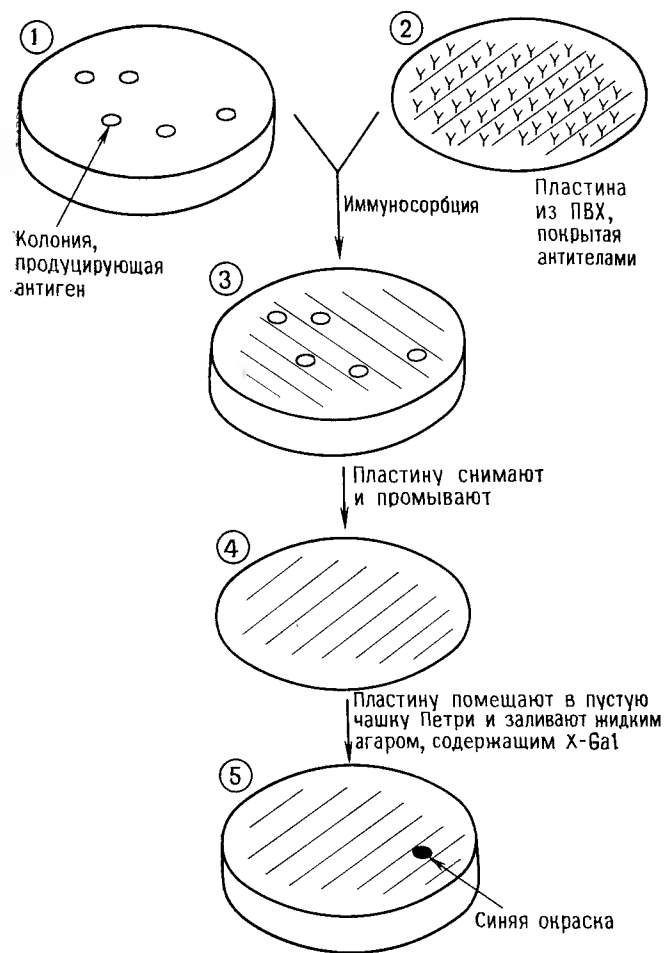


Рис. 5. Иммуоферментная идентификация клонов. Колонии лизируют хлороформом (1). Пластины из ПВХ покрывают антителами (2) и помещают на лизированные колонии для сорбции антигена (3). Пластины промывают и помещают в пустые чашки Петри (4). Пластины заливают агаром, содержащим гистохимический краситель X-Gal. Участки, на которых адсорбировалась химерная β -галактозидаза, окрашиваются в синий цвет (5).

колоний различными антисыворотками. Колонии на фильтрах лизируют хлороформом. Налейте в стеклянную чашку Петри 20 мл хлороформа и погружайте в нее каждый фильтр на 1 мин. Выньте фильтр пинцетом и положите его на 3 мин на фильтровальную бумагу. Снова поместите фильтр на чашку с агаром и проинкубируйте 5 мин при 37 °C для удаления остатков хлороформа. Храните чашки при 4 °C.

4.4. Иммуносорбция

Пластины, покрытые антителами и насыщенные BSA, извлеките из промывочного раствора с помощью пинцета. Если бактериальные колонии лизировали хлороформом на стеклянных чашках Петри, необходимо удалить избыток жидкости с пластины, прикоснувшись ее краем к фильтровальной бумаге. Держа пластину пинцетом, наложите ее на колонии, стараясь совместить отметки на пластине с отметками на чашке. Не допускайте образования пузырей между агаром и пластиной! Если пузыри все же появились, осторожно удалите их, слегка надавливая на пластину концом пинцета. Проинкубируйте 1 ч при 4 °C для образования комплексов антигена с антителом.

Если колонии лизировали на нитроцеллюлозных фильтрах, поместите пластину, не высушивая ее, прямо на находящиеся на фильтре колонии. В этом случае избыток промывочного раствора помогает избежать появления пузырей. Проинкубируйте пластину с нитроцеллюлозным фильтром 1 ч при 4 °C.

4.5. Промывка

Снимите пластины с чашек и поместите в сосуд с промывочным раствором. Большая часть бактериальной массы колоний прилипает к пластинам. Этой массе дают набухнуть, инкубируя пластины, полностью покрытые промывочным раствором, в течение 20 мин при комнатной температуре. Весь неспецифически налипший материал можно теперь удалить, промывая пластины струей промывочного раствора из шприца объемом 20 мл. Для этого пластины помещают грязной стороной вверх в стеклянный сосуд с большой поверхностью. Чтобы грязь смывалась с фильтра, сосуд держат под углом (рис. 6). Следите за тем, чтобы пластины не соскальзывали в грязный промывочный раствор. В конце промывки не должно быть видно никаких следов колоний. Если грязь не смылась полностью, выдержите пластины еще 5—10 мин в свежем промывочном растворе. Чистые пластины промойте еще раз в течение 1 мин свежим раствором и поместите в пустые чашки Петри так, чтобы несущая иммунные комплексы сторона смотрела вверх.

4.6. Идентификация колоний, продуцирующих антигены

1. Расплавьте агар (3 г на литр воды) и держите его при 40 °C.
2. Смешайте равный объем жидкого агара с двукратным буфером TMSII, нагретым до 40 °C, внесите X-Gal до концентрации 0,16 мг/мл.
3. Охладите до 37 °C и залейте каждую пластину примерно 15 мл агара.

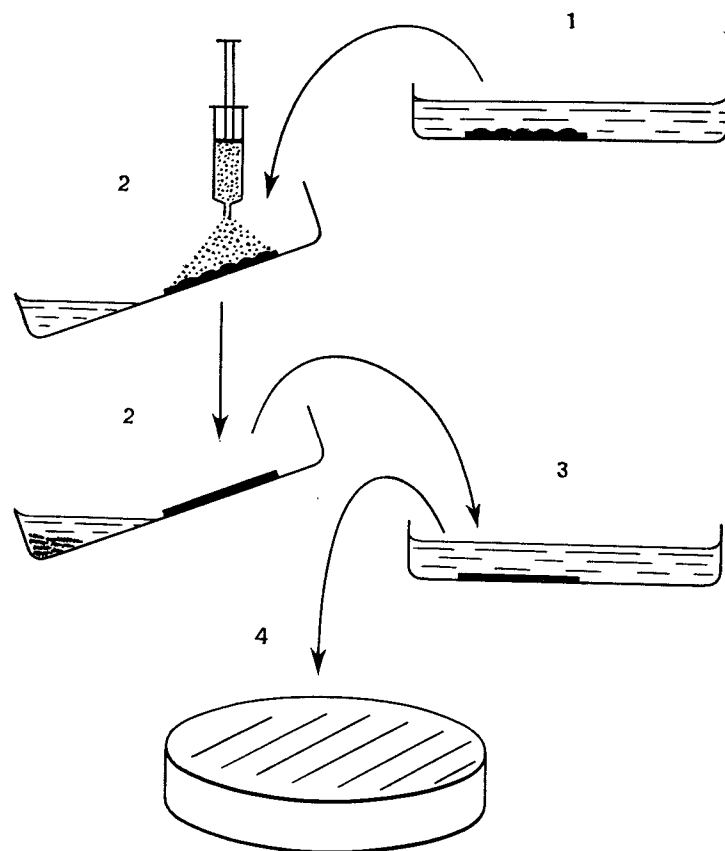


Рис. 6. Промывка: замочите пластины с прилипшими к ним колониями в промывочном растворе (1). Смойте бактериальную массу при помощи шприца (2). Промойте пластины в свежем растворе (3). Поместите чистые пластины в пустые чашки Петри (4). См. также раздел 4.5.

4. Когда агар застынет, проинкубируйте пластины при 37 °C в темноте. (X-Gal чувствителен к свету. На свету агар желтеет!)

X-Gal гидролизует β -галактозидазой, входящей в состав химерного белка, связавшегося с антителом. Скорость появления окраски зависит от количества экспрессированной β -галактозидазы, качества антигена, количества и чистоты антител. Для появления окраски может понадобиться от 2 до 20 ч. По нашему опыту, при использовании антител к индивидуальному белку (*lac*-репрессор, лизоцим курицы) видимая окраска появляется примерно через 5 ч [5, 6]. При использовании антител, по-

лученных против смеси белков, окраска становится заметной через 12—20 ч. Колония, продуцирующая узнаваемый антителами антиген, проявляется в виде гомогенного синего облачка, сравнимого по размеру с лизированной колонией. Гомогенная окраска характерна только для дающих положительный сигнал клонов. При недостаточной промывке могут появляться ложные сигналы и фон. В таких случаях на границах колоний видны небольшие синие пятнышки, а гомогенного облачка синего цвета, характерного для положительного сигнала, не наблюдается. Все дающие положительный сигнал колонии необходимо проверять, заново рассеивая их из колонии, хранившейся на эталонной чашке, и заново трансформируя бактерии содержащимися в них плазмидами.

4.7. Очистка химерных β -галактозидаз

Одно из преимуществ описываемой системы состоит в том, что любой антиген можно выделить из экстракта клеток *E. coli* в гомогенном виде в один этап. Очищенный антиген в виде химерного (состыкованного с β -галактозидазой) белка можно прямо использовать для иммунизации. Для очистки химерных β -галактозидаз мы применяем метод Стирса с соавт. [21], в котором используется аффинная хроматография на *p*-амино- β -D-тиогалактозидагарозе. Вариант этого метода описан Ульманом [22].

1. Инкубируйте клетки в 200 мл жидкой богатой среды в течение ночи. Для повышения стабильности химерных белков выращивайте клетки при комнатной температуре.

2. 1 г клеток ресуспендируйте в 1 мл 10 mM трис-HCl pH 7,5; 10 mM ацетата магния; 200 mM NaCl; 0,1 mM ЭДТА; 1 mM ДТЕ (буфер А).

3. Обработайте клетки 3 раза по 1 мин ультразвуком на ледяной бане с NaCl (Branson Sonifier, мощность 100 Вт).

4. Для осаждения обломков клеток центрифугируйте 1 ч при 40 000 g. Осадок проверьте на наличие β -галактозидазной активности методом Миллера [18]. Если основная активность обнаруживается в надосадке, осадок можно отбросить.

5. Разбавьте надосадок, содержащий 35—45 мг/мл белка, равным объемом буфера А и нанесите его на 1 мл колонку с *p*-аминофенил- β -D-тиогалактозидагарозой (Sigma), уравновешенную буфером А.

6. Для удаления неспецифически связанных белков промойте колонку 50—100 мл буфера А. Промывку ведите до тех пор, пока с колонки не перестанет в заметных количествах смываться белок.

7. Элюируйте связанную химерную β -галактозидазу тремя объемами колонки 100 mM Na-бората pH 10,05.

8. Немедленно отдиализуйте против 500 мл 40 мМ трис-HCl pH 7,5; 1 мМ MgCl₂; 0,1 мМ ЭДТА; 1 мМ ДТЕ; 50% глицерина в течение 5 ч и храните при -20 °C.

Полученные таким образом химерные белки более чем на 90% гомогенны по данным электрофореза в ПААГ в присутствии SDS [23]. Чтобы не допустить деградации химерных белков, образцы для электрофореза готовят, прогревая их (вместо кипячения) 30 мин при 55 °C. Концентрацию белка можно определить методом Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин [24]. Активность β-галактозидазы определяют методом Миллера [18]. Все операции по очистке проводят при 4 °C.

5. Общие замечания

Рекомбинантные плазмиды, введенные в клетки F11 *rec A*, стабильны и продуцируют большие количества химерных β-галактозидаз. Исключение из этого правила представляют собой химерные β-галактозидазы, возникающие в результате реинициации синтеза белка в области ДНК-вставки, клонированной в 5'-концевой зоне гена *lac Z*. В большинстве случаев длина субъединицы химерного белка (по данным SDS-электрофореза) пропорциональна длине вставки. При отборе клонов с помощью антител одновременно происходит селекция на стабильность антигена. Тем не менее для того, чтобы гарантированно обеспечить стабильность химер, мы выращиваем клетки при комнатной температуре. По нашим наблюдениям вставки, окруженные poly-Gly или poly-Pro, стабильны. Стабильность обычно высока, если экспрессируемый полипептид включает полную структурную единицу (белковый домен). В 3'-концевой области гена *lac Z* имеет смысл клонировать лишь С-концевые последовательности белка, а не его внутренние фрагменты. В тех случаях, когда ДНК-вставка кодирует сильно гидрофобные полипептиды, например лидерные или внутримембранные последовательности, химерный белок может оказаться нерастворимым. Для идентификации антигенов, экспрессируемых последовательностями, которые клонированы в 5'- или 3'-областях гена *lac Z*, можно использовать меченный иодом А-белок [25]. Результаты, полученные с помощью этого метода, а также описанного выше иммуноферментного метода, оказались сходными.

Особенно важно то, что при поиске клонов нет необходимости знать структуру антигена. Нужны лишь антитела к этому антигену и экспрессируемая библиотека достаточного объема. Описанную нами систему клонирования можно приспособить и для векторов на основе фага λ. По нашему мнению, именно здесь кроются возможности для дальнейшего усовершенствования и применения метода.

Литература

1. Müller-Hill B., Kania J. *Nature*, **249**, 561 (1974).
2. Roberts T. M., Kacich R., Ptashne M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 760 (1979).
3. Guarente L., Lauer G., Roberts T. M., Ptashne M. *Cell*, **20**, 543 (1980).
4. Casadaban M. J., Martinez-Arias A., Shapira S. K., Chou J. In: *Methods in Enzymology*, Wu R., Grossman L. and Moldave U. (eds.). Academic Press, New York, p. 293, 1983.
5. Koenen M., Rüther U., Müller-Hill B. *EMBO J.*, **1**, 509 (1982).
6. Rüther U., Koenen M., Sippel A. E., Müller-Hill B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6852 (1982).
7. Gray M. R., Colot H. V., Guarente L., Rosbash M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6598 (1982).
8. Zabeau M., Stanley K. K. *EMBO J.*, **1**, 1217 (1982).
9. Weinstock G. M., Aphys C., Berman M. L., Hampar B., Jackson D., Silhavy T. J., Weisemann J., Zweig M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4432 (1983).
10. Weis H. J., Enquist L. W., Salstrom J. S., Watson R. J. *Nature*, **302**, 72 (1983).
11. Roy A., Danchin A., Josef E., Ullmann A. J. *Mol. Biol.*, **165**, 197 (1983).
12. Rüther U., Müller-Hill B. *EMBO J.*, **2**, 1791 (1983).
13. Rüther U. Thesis, Cologne, 1983.
14. Maxam A. M., Gilbert W. In: *Methods in Enzymology*, Grossman L., and Moldave K. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 65, p. 499 (1980).
15. Rüther U. *Nucleic Acids Res.*, **10**, 5765 (1982).
16. Messing J., Vieira J. *Gene*, **19**, 269 (1982).
17. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463 (1977).
18. Miller J. M. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1972.
19. Porter R. R. *Biochem. J.*, **73**, 119 (1959).
20. Hanahan D., Meselson M. In: *Methods in Enzymology*, Wu R., Grossman L. and Moldave K. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 100, p. 333 (1983).
21. Steers E. J., Cuatrecasas P., Pollard H. B. *J. Biol. Chem.*, **246**, 196 (1971).
22. Ullmann A. *Gene*, **29**, 27 (1984).
23. Laemmli U. K. *Nature*, **227**, 680 (1970).
24. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
25. Kemp D. J., Coppel R. L., Cowmann A. F., Saint R. B., Brown G. V., Anders R. F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3787 (1983).

СЕМЕЙСТВО ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ ВЕКТОРОВ pEMBL

Лючиана Денте, Маурицио Соллаццо, Козима Бальдари,
Джанни Чезарени и Рикардо Кортесе

1. Введение

Одноцепочечные векторы применяются во многих лабораториях для определения нуклеотидной последовательности ДНК, направленного мутагенеза, S1-картирования и приготовления одноцепочечных зондов для гибридизации. Наиболее широко используются разработанные Мессингом с соавт. [1, 2] производные M13. На практике, однако, применение векторов на основе M13 имеет некоторые ограничения. Неоднократно наблюдалось, например, что вставки большого размера в этих векторах нестабильны. Кроме того, во многих случаях необходимо клонировать фрагмент ДНК в плазмидах, сконструированных для определенных целей. Это могут быть челночные плазмидные векторы, способные размножаться в клетках либо прокариот, либо эукариот, или же векторы, предназначенные для экспрессии в обеих этих системах. Было бы удобно, если бы любую специализированную плазмиду можно было получать в одноцепочечной форме, пригодной для определения нуклеотидной последовательности, направленного мутагенеза и т. п. Дотто с соавт. клонировали в *EcoRI*-сайте плазмиды pBR322 область генома фага f1, содержащую все *цис*-действующие элементы, необходимые для репликации ДНК и морфогенеза [3, 4]. Эти же исследователи показали, что при суперинфекции несущих такую плазмиду клеток фагом f1 примерно половина секретируемых в культуральную среду вирионов несет одноцепочечную ДНК f1, а другая половина — одноцепочечную ДНК pBR322. Мы использовали этот факт для конструирования нового семейства векторов.

2. Семейство pEMBL

Векторы семейств pUC или mp [1, 2] весьма универсальны, так как позволяют внедрять фрагменты чужеродной ДНК в различные рестрикционные сайты небольшого полилинкера, находящегося в кодирующей последовательности α -пептида β -галактозидазы. При этом появляется возможность клонировать фрагменты ДНК в выбранной ориентации или в нужной трансляционной рамке считывания. Рекомбинантные клоны бактерий можно легко идентифицировать по их окраске на соответствующих индикаторных чашках, не прибегая к приготовлению реплик-

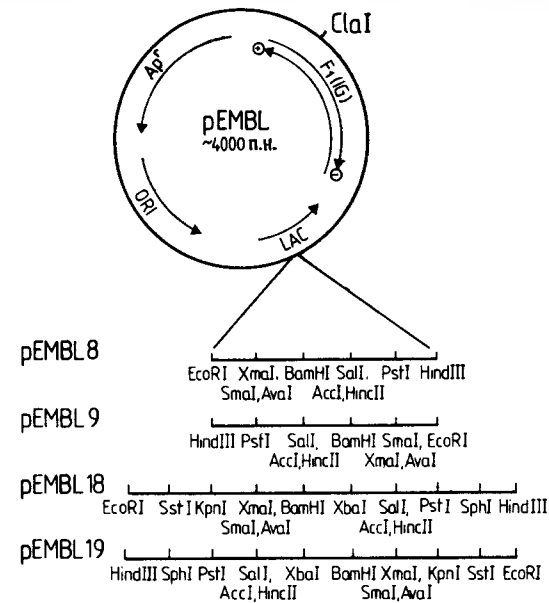


Рис. 1. Физическая карта плазмид pEMBL.

Для того чтобы расширить возможности применения этих плазмид, мы клонировали *EcoRI*-*EcoRI*-фрагмент генома f1 (1300 п.н.) из плазмиды pD4 [3] в уникальном *NarI*-сайте, имеющемся во всех плазмидах серии pUC. Сконструированные плазмиды (семейство pEMBL [5]) сохранили все свойства плазмид pUC. Они имеют тот же участок начала репликации, кодируют устойчивость к ампициллину и, кроме того, способны к синтезу α -пептида β -галактозидазы. Бактерии, несущие такие плазмиды, на хромогенном субстрате 5-бромо-4-хлоро-3-индолил- β -D-галактозиде (X-Gal) образуют синие колонии. Обычно ген α -пептида в рекомбинантных плазмидах инактивируется и колонии бактерий на чашках с X-Gal оказываются бесцветными. Кроме того, плазмиды pEMBL содержат интактную область начала репликации фага f1, которая активируется при суперинфекции клеток этим фагом. При этом происходит накопление одноцепочечной плазмидной ДНК, которая упаковывается и секретируется в культуральную среду в виде вириноподобной частицы. Ориентация фрагмента ДНК f1 длиной 1300 п.н. определяет, какая из двух цепей будет упаковываться в вирусную частицу. Согласно этому, векторы обозначаются как pEMBL(+) и pEMBL(-). При использовании векторов pEMBL(+) в продуцируемых клетками после суперинфекции вирионах содержится

некодирующая цепь β -галактозидазы, а в случае векторов pEMBL(—) вирионы содержат кодирующую цепь этого гена. Физическая карта плазмид pEMBL приведена на рис. 5.1.

3. Одноцепочечные плазмидные векторы для специальных целей

Возможность нарабатывать плазмидную ДНК в одноцепочечной форме полезна и в случае специализированных плазмид. В принципе любую из существующих плазмид можно превратить в плазмиду «типа pEMBL», если ввести в нее фрагмент, несущий участок начала репликации фага f1. Мы использовали этот подход для конструирования специализированных челночных дрожжевых векторов и экспрессирующих векторов для *E. coli*.

Векторы pEMBL — это семейство векторов, полученных из плазмиды pEMBL9 путем введения в ее уникальный *Cla*I-сайт различных фрагментов дрожжевой ДНК. Дрожжевая ДНК несет генетические детерминанты, которые можно использовать в качестве селективных маркеров на подходящих мутантных штаммах дрожжей (Бальдари и Чезарени, готовится к печати). Кроме того, некоторые из фрагментов дрожжевой ДНК способны поддерживать репликацию плазмид непосредственно в *S. cerevisiae*. Дрожжевые векторы, не содержащие области начала репликации ДНК, трансформируют дрожжевые клетки с низкой эффективностью [6]. Эти векторы называют интегрирующимися, так как стабильные трансформанты образуются в результате их генетической рекомбинации с гомологичными последовательностями хромосом. Дрожжевые плазмиды, несущие области начала репликации дрожжей, трансформируют клетки на три порядка эффективнее, чем интегрирующиеся векторы. Область начала репликации можно либо «позаимствовать» из эндогенной дрожжевой 2 мкм-плазмиды, либо ввести в виде *ars*-последовательности [7]. *Ars*-последовательности найдены в ДНК многих эукариот, и в дрожжах, вероятно, функционируют как области начала репликации [8]. Семейство pEMBL включает плазмиды всех этих типов, а также векторы, позволяющие отбирать трансформанты по комплементации генов *LEU2*, *URA3* или *TRP1*. Физические карты плазмид pEMBL приведены на рис. 2. Для клонирования используют уникальные рестрикционные сайты, расположенные в области, кодирующей α -пептид β -галактозидазы.

Второй вид специализированных одноцепочечных плазмидных векторов «типа pEMBL» предназначен для экспрессирующих систем. Нашей целью было создать экспрессирующий вектор, в котором синтез интересующего исследователя белка направляется иницирующим AUG-кодоном вектора. Впоследствии можно

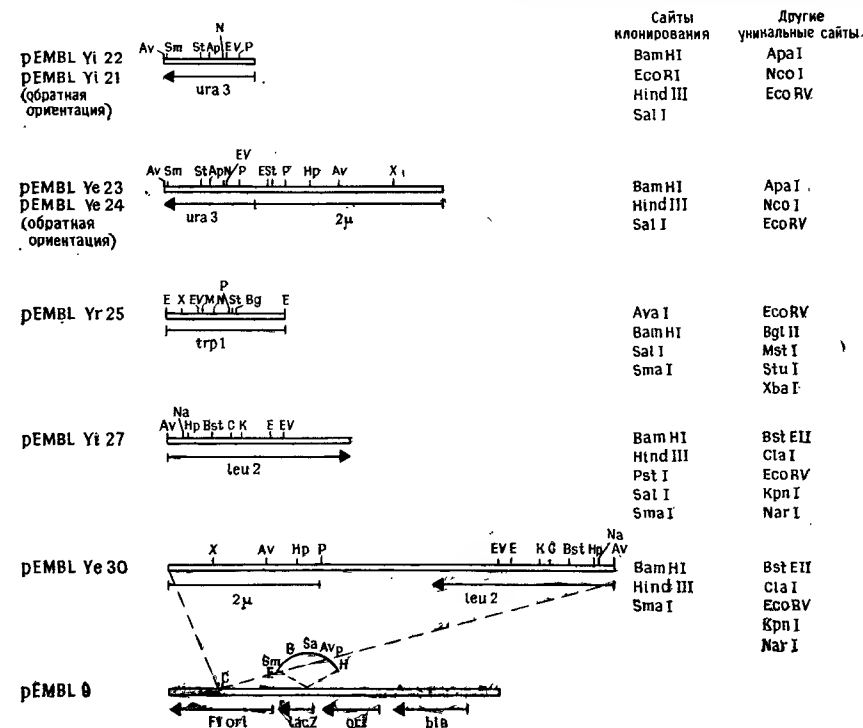


Рис. 2. Схема, представляющая физические и генетические карты плазмид pEMBL. Позиции рестрикционных сайтов определены на основании нуклеотидных последовательностей pEMBL9 [5], *URA3* [11], *TRP1* [12] и 2мкм-плазмиды [13]. Прямой анализ последовательности не проводился. Мы считаем, что после различных ферментативных обработок перестроек и делеций на границах между фрагментами ДНК не происходило. Уникальные сайты рестрикции в кодирующей последовательности α -пептида были проверены при помощи расщепления рестриктазами соответствующих плазмид и анализа продуктов электрофорезом в 1%-ном агарозном геле. Сокращенные обозначения рестриктаз: E=EcoRI, N=NcoI, EV=EcoRV, St=StuI, Hp=HpaI, M=MstI, Bg=BglII, X=XhoI, K=KpnI, Bst=BstII, N=NarI. Стрелками показаны направления транскрипции и репликации.

было бы с высокой точностью делетировать ненужные последовательности в процессе отжига одноцепочечного вектора со специфическим олигонуклеотидом, репарации *in vitro* и разделения мутантной и дикой форм в потомстве фага. Методика мутагенеза *in vitro* описана в гл. 8 этой книги. Этот метод не требует внесения случайных делеций при помощи ферментов и трудоемкого отбора клонов на основе анализа их нуклеотидной последовательности. Если имеется конструкция, обуславливающая сверхпродукцию нужного белка, то направляемый олигонуклеотидом мутагенез можно провести прямо на ней. Полученную плазмиду,

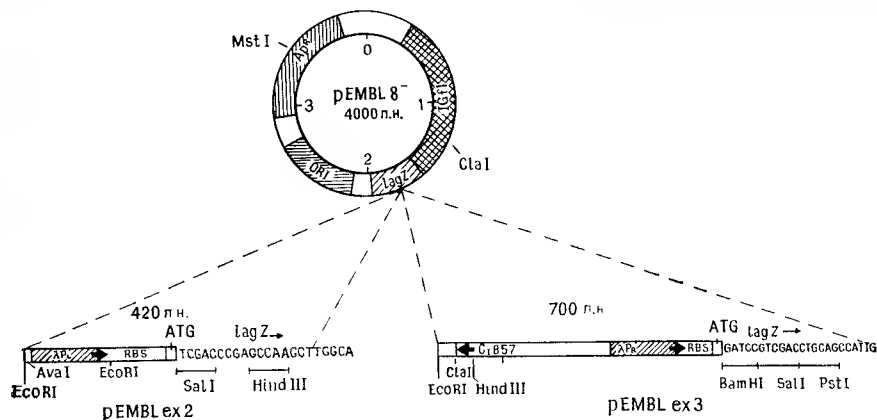


Рис. 3. Физические карты экспрессирующих векторов pEMBLex2 и pEMBLex3. О нуклеотидной последовательности полилинкера этих векторов судили по последовательности образовавших его фрагментов, с учетом проводившихся при клонировании ферментативных обработок. RBS — участки связывания рибосом гена репликазы MS2 и гена *λcro*.

несущую мутантную кодирующую последовательность, можно сразу использовать для наработки в *E. coli* больших количеств продукта измененного гена.

Наши плазмиды сконструированы на основе двух плазмид, которые содержат промотор P_L или P_R фага λ . Эти промоторы обеспечивают транскрипцию в направлении последовательностей, включающих участок связывания с рибосомой и иницирующий AUG-кодон генов репликазы фага MS2 [9], или сгобелка фага λ [10]. Эти фрагменты были вставлены в полилинкер плазмиды pEMBL8 таким образом, что для определения последовательности от кодона AUG и далее могла быть использована универсальная затравка, комплементарная участку связывания с рибосомой (рис. 3). Иницирующий кодон AUG расположен в одной трансляционной рамке с последовательностью, кодирующей α -пептид β -галактозидазы, что позволяет проводить скрининг рекомбинантов по цветной реакции на чашках, содержащих X-Gal. Удобные для клонирования уникальные рестрикционные сайты находятся сразу за иницирующим кодоном.

4. Методика получения одноцепочечной ДНК pEMBL

Процедура получения препарата фага f1 для суперинфекции бактерий, несущих плазмиды pEMBL, описана в табл. 1. Методика суперинфекции клеток и выделения одноцепочечной ДНК приведена в табл. 2. Полученная таким образом ДНК пригодна для определения нуклеотидной последовательности. Выход одноцепочечной ДНК из 1 мл культуры составляет около 0,5 мкг.

Таблица 1. Получение препарата фага f1

1. Внесите в 1 мл L-бульона¹⁾ содержимое отдельной бляшки фага f1²⁾ и инкубируйте 3 часа при 37 °C.
2. Разбавьте культуру 200 мл L-бульона.
3. Продолжайте инкубацию при 37 °C в течение ночи.
4. Осадите клетки центрифугированием и соберите надосады, содержащий секретированные клетками фага.
5. Определите титр фага в надосаде при помощи серийных разведений L-бульоном. Аликвоты разведений объемом 0,1 мл смешайте с 0,2 мл стационарной культуры *E. coli* 71/18³⁾. Добавьте 3 мл расплавленного и хранившегося при 45 °C верхнего слоя и вылейте на чашку с L-агаром⁴⁾. Количество бляшек подсчитайте через 8 ч инкубации при 37 °C. Надосады можно хранить 1–2 месяца при 4 °C, а длительное время — заморозив аликвоты при –20 °C.

¹⁾ Состав L-бульона: бакто-триптон — 10 г; дрожжевой экстракт — 5 г; NaCl — 10 г; H₂O — до 1 л; pH доводят до 7,5 NaOH.

²⁾ Мы используем штамм IR1 [3].

³⁾ Генотип *E. coli* 71/18 $\Delta[lac-pro]F' lacI^q lacZ \Delta M15 pro^+ supE$.

⁴⁾ L-агар содержит 15 г бакто-агара на 1 л L-бульона; верхний слой — 7 г бакто-агара на 1 л L-бульона.

Таблица 2. Получение одноцепочечной ДНК-матрицы

1. Внесите в 1 мл L-бульона, содержащего 100 мкг/мл ампициллина, свежую колонию бактериальных клеток, несущих плазмиду pEMBL, и инкубируйте до насыщения при 37 °C.
2. Разбавьте культуру в 50 раз L-бульоном и растите до ОП₆₆₀ = 0,2.
3. Инфицируйте клетки препаратом фага f1 (IR1), приготовленным согласно табл. 1, при множественности инфекции 20 бляшкообразующих единиц (б.о.е.) на клетку¹⁾. Продолжайте культивировать клетки при 37 °C в течение 6 ч.
4. Отцентрифугируйте 1 мл культуры в течение 5 мин в микроцентрифуге.
5. Осторожно (чтобы не взболтать осадок) отберите 800 мкл надосадовой жидкости.
6. Добавьте к надосаду 200 мкл 2,5 М NaCl, 20% полиэтиленгликоля (ПЭГ) 6000 и проинкубируйте 15 мин при комнатной температуре. Отцентрифугируйте 5 мин в микроцентрифуге.
7. Очень осторожно удалите надосады, осадок растворите в 100 мкл 10 мМ трис-HCl pH 8,0; 1 мМ ЭДТА. Экстрагируйте белки, осторожно встряхивая раствор со 100 мкл фенола, насыщенного 0,1 М трис-HCl pH 9,0; 10 мМ ЭДТА.
8. Отцентрифугируйте 1 мин для разделения фаз. Осторожно отберите водную фазу (~80 мкл), добавьте к ней 50 мкл изопропанола и 20 мкл 5 М перхлората натрия.
9. Осадите нуклеиновые кислоты центрифугированием в течение 15 мин. Удалите надосады и растворите осадок (почти невидимый) в 100 мкл 0,3 М ацетата натрия. Для переосаждения нуклеиновых кислот добавьте 300 мкл этанола.
10. Отцентрифугируйте 15 мин. Осторожно удалите надосады и ресуспендируйте осадок в 30 мкл 10 мМ трис-HCl pH 7,5; 0,1 мМ ЭДТА.

¹⁾ При ОП₆₆₀ = 0,2 культура содержит примерно $2 \cdot 10^8$ клеток/мл.

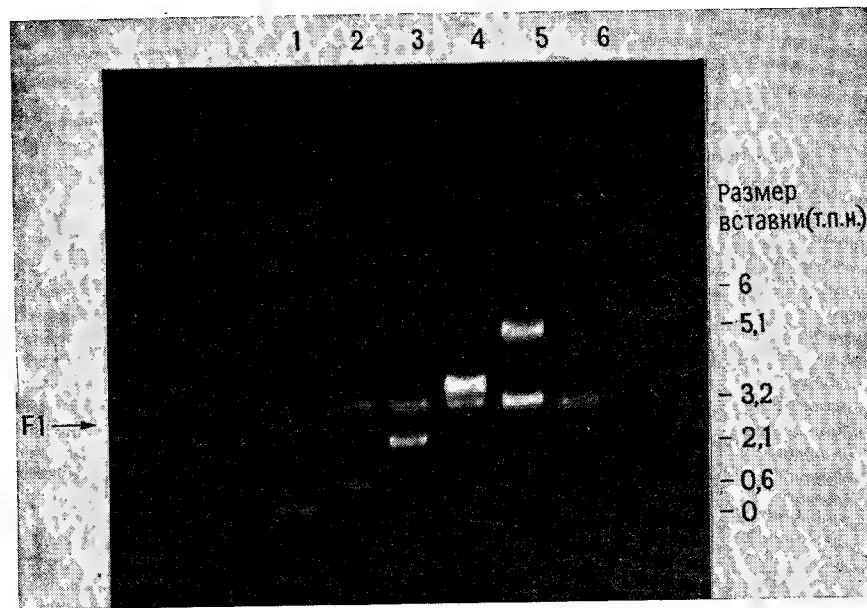


Рис. 4. Электрофорез в 1%-ном агарозном геле одноцепочечной ДНК. Можно оценить относительную эффективность упаковки рекомбинантных плазмид pEMBL, содержащих вставки различного размера.

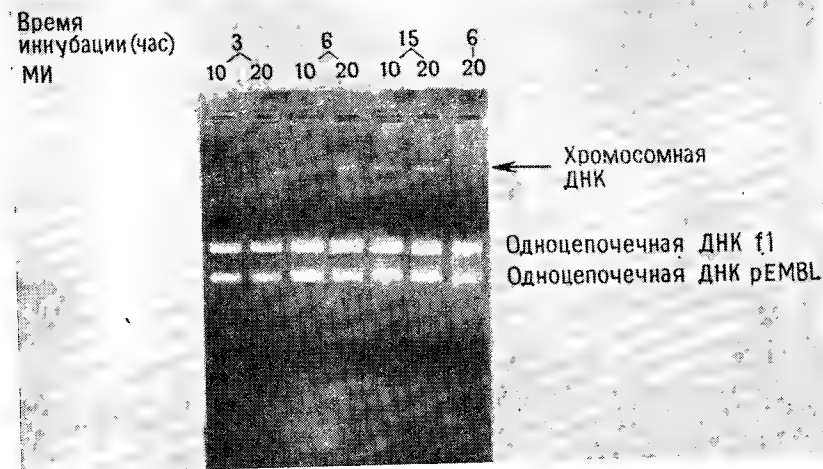


Рис. 5. Продукция одноцепочечной ДНК при различных условиях. Клетки *E. coli* 71/18, несущие плазмиду pEMBL8, выращивали до $OP_{660}=0,2$ и заражали фагом f1 IRI при множественности инфекции (МИ) 10 или 20 б.о.е. на клетку. После инкубации при 37°C в течение указанного периода одноцепочечную ДНК выделяли описанным в табл. 2 методом и анализировали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле. Дорожка 6 содержит ДНК, приготовленную из клеток, инфицированных при $OP_{660}=0,4$ и МИ 20 б.о.е. на клетку.

Общий выход ДНК и соотношение ДНК f1/плазмидная ДНК могут изменяться в 2—3 раза, однако нам не удалось установить причины этих колебаний. В небольшом числе случаев колонии бактерий, содержащих плазмиды типа pEMBL, вообще не продуцировали одноцепочечной плазмидной ДНК. Мы предполагаем, что причина этого заключена в каких-то индивидуальных различиях между колониями, поскольку одноцепочечную ДНК в таких случаях все-таки можно получить, если проанализировать большее число колоний или заново трансформировать бактерии плазмидой. Эффективность синтеза и секреции одноцепочечной ДНК зависит от количества двухцепочечной ДНК, присутствующей в клетках в момент суперинфекции фагом f1. В некоторых случаях вставка чужеродной ДНК мешает репликации плазмиды, что приводит к уменьшению числа ее копий. Такие рекомбинанты продуцируют значительно меньше одноцепочечной ДНК, чем ДНК f1, и именно такими свойствами обладают описанные здесь экспрессирующие векторы. Мы заметили также, что эффективность упаковки содержащих сильные промоторы плазмид обратно пропорциональна активности этих промоторов. Одноцепочечную ДНК векторов pEMBLex1 и pEMBLex2 можно получить только тогда, когда λ -промотор полностью репрессирован эндогенным геном cI. Эффективность упаковки мало зависит от размера плазмид (см. рис. 4). Изменение в широких пределах как множественности инфекции, так и концентрации клеток в момент инфекции, по-видимому, не отражается на эффективности упаковки (рис. 5). При длительной инкубации при 37°C после инфекции f1, однако, одноцепочечная ДНК оказывается загрязненной хромосомной ДНК. Вероятно, это обусловлено массовой гибелью клеток на поздней стационарной фазе.

Благодарности

Мы благодарим И. Беннер за перепечатку рукописи.

Литература

- Messing J. *Methods Enzymol.*, **101**, 20 (1983).
- Novander J., Kempe T., Messing J. *Gene*, **26**, 101 (1983).
- Dotto G. P., Enea V., Zinder H. D. *Virology*, **114**, 463 (1981).
- Dotto G. P., Horiuchi K. J. *Mol. Biol.*, **153**, 169 (1981).
- Dente L., Cesareni G., Cortese R. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 1645 (1983).
- Hinnen A., Hicks J. B., Fink J. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1929 (1978).
- Struhl K., Stinchcomb D. T., Scherer S., Davis R. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1035 (1979).
- Stinchcomb D. T., Thomas M., Kelly J., Selker E., Davis R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4559 (1980).
- Remaut H., Stanssens P., Fiers W. *Nucleic Acids Res.*, **11**, 4677 (1983).
- Queen C. J. *Mol. Appl. Genet.*, **2**, 1—10 (1983).
- Rose M. Ph. D. thesis, M.I.T., 1982.
- Tschumper G., Carlson J. *Gene*, **10**, 157 (1980).
- Hartley J. L., Donelson J. E. *Nature*, **286**, 157 (1980).

МЕТОДЫ ТРАНСФОРМАЦИИ *E. COLI*

Дуглас Ханаан

1. Введение

Методы введения плазмид в клетки *E. coli* — неотъемлемая часть методического арсенала молекулярной биологии. Трансформация *E. coli* плазмидами была впервые продемонстрирована Коэном с соавт. [1] вскоре после того, как Мандель и Хига [2] показали, что совместная инкубация *E. coli* и бактериофага λ при 0°C в присутствии CaCl_2 приводит к инфекции (в действительности — к трансфекции). С этого момента феномену трансформации клеток плазмидами посвящалось значительное число исследований, целью которых являлось как повышение эффективности трансформации, так и изучение влияющих на нее факторов [3—15].

Эти исследования привели к представлению о том, что клетки *E. coli* и чужеродная ДНК продуктивно взаимодействуют при низких температурах в среде, содержащей двухвалентные катионы. Частоту трансформации можно повысить различными способами: подвергая смесь клеток и ДНК тепловому шоку; вводя в эту смесь моновалентные катионы; добавляя хлорид гексаминокобальта(III); обрабатывая клетки растворителями и сульфгидрильными реагентами; выращивая клетки в среде с повышенным содержанием магния (10—20 мМ). Такие обработки повышают частоту трансформации с $1/10^5$ до более чем $1/10^2$ (т. е. одна из 100 внесенных молекул плазмиды трансформирует клетку).

В этой главе описан ряд методик плазмидной трансформации, начиная с классической кальциевой (простой, но малоэффективной) до сложной, высокоэффективной, дающей необходимую для клонирования высокую частоту трансформации. В табл. 1 приведена сводка различных методик, подробно описанных ниже.

2. Выбор штамма

Выбор конкретного штамма *E. coli* диктуется целью эксперимента и в ряде случаев применяемой методикой трансформации. Можно дать несколько общих рекомендаций. Штамм *E. coli* C600 [16] и его производные хорошо растут и эффективно трансформируются всеми описанными здесь методами. Штамм

Таблица 1. Методики трансформации

Таблица	Методика	Средняя частота трансформации ¹⁾	Применимость	Примечание
2	Простая трансформация	10^5 — 10^7	MC1061 ²⁾ , C600 ³⁾ , DH1 ⁴⁾ , большая часть производных K12	Вариант оригинальной методики [2]. Проста, но малоэффективна
3	Стандартная трансформация	2 — $7 \cdot 10^8$	DH1, C600, JM109 ⁵⁾ , многие производные K12	Наивысшая частота трансформации и наивысшая доля компетентных клеток. Чувствительна к загрязнению H_2O и диметилсульфоксида (ДМСО)
4	Трансформация колоний	$0,5$ — $2 \cdot 10^8$	DH1, C600, JM109, многие производные K12	Быстрая и удобная методика, хороша для большинства целей (не требует жидкой культуры)
5	Быстрая трансформация	10^3 — 10^4	Большинство производных K12	Очень быстрая и малоэффективная методика, полезна для ретрансформации клонированных плазмид
6	С замораживанием клеток I	10^5 — 10^7	MC1061, C600, DH1, большинство производных K12	Удобна, но малоэффективна
7	С замораживанием клеток II	10^7 — 10^8	DH1, C600, JM109, большинство производных K12	Удобна и эффективна. Чувствительна к загрязнению H_2O и ДМСО
8	С замораживанием клеток III	10^7 — 10^8	DH1, C600, HB101, JM109	Удобна и эффективна. Не требует ДМСО
9	Для трансформации $\chi 1776$	10^8	$\chi 1776^6$	Рекомендуется только для экспериментов в условиях ЕКП и для трансформации мутантов по клеточной стенке

¹⁾ Частота трансформации выражена в числе колоний, образующихся в расчете на 1 мкг ДНК pBR322.

²⁾ Генотип *E. coli* MC1061: F⁻, *araD139*, Δ (*ara*, *leu*)7696, Δ *lac* Y74, *galU*⁻, *galK*⁻, *hcr*⁻, *hsm*⁺, *strA*.

³⁾ Генотип *E. coli* C600: F⁻, *supE44*, *thi-1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*, λ ⁻.

⁴⁾ Генотип *E. coli* DH1: F⁻, *endA1*, *hsdR17*(*rk*⁻, *mk*⁺), *supE44*, *thi-1*, λ ⁻, *recA1*, *gyrA96*, *relA1*.

⁵⁾ Генотип *E. coli* JM109: *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, λ ⁻, Δ (*lac-proA,B*), F', *traD36*, *proA,B*, *lacIqZ-M15*.

⁶⁾ Генотип *E. coli* $\chi 1776$: F⁻, *tonA53*, *dapD8*, *minA1*, *gluU44*, (*supE42*), Δ (*gal-uvrB*)40, λ ⁻, *minB2*, *rjb-2*, *gyrA25*, *thyA142*, *oms-2*, *metC65*, *oms-1*, (*tte-1*), Δ (*bioH-asd*)29, *cycB2*, *hsdR2*.

MC1061 [17] очень хорошо подходит и довольно широко используется для трансформации «простыми» методами с применением CaCl_2 . Этот штамм, однако, не поддается эффективной трансформации теми методами, которые подразумевают применение диметилсульфоксида (ДМСО), и может быть рекомендован только для кальциевой трансформации.

При работе с рекомбинантными ДНК удобно использовать производные полученного Хоффманом Берлингом штамма 1100 [18]. Они эффективно трансформируются всеми описанными ниже методами. Штаммы хорошо растут и дают превосходный выход плазмидной ДНК. Дефектность по эндонуклеазе A увеличивает выход и улучшает качество плазмидной ДНК при получении ее в аналитических количествах. Рекомендуемые производные штамма 1100 — это MM294 [18], DH1 [15] и JM109 (Дж. Мессинг, личное сообщение). JM109 — новый *recA*–хозяин для фага M13, полученный из DH1. Он дефектен по K-системе рестрикции, не является лизогенным и потому больше всего подходит на роль хозяина при клонировании в M13 (Дж. Мессинг, личное сообщение). Штамм DH1 несет мутацию *recA1*. Этот штамм хорошо использовать в качестве хозяина при работе с рекомбинантными ДНК, для «спасения» интегрированных плазмид и для клонирования больших фрагментов ДНК.

Недавно выделен производный от DH1 штамм DH5. Этот штамм трансформируется приведенными здесь методами значительно лучше, чем DH1. Эффективность его трансформации при использовании простой методики достигает $2 \cdot 10^7$ трансформантов/мкг ДНК pBR322 и $4\text{--}12 \cdot 10^8$ трансформантов/мкг для стандартного высокоэффективного метода. Бактерии DH5 можно трансформировать большими (40–60 т. п. н.) плазмидами в 10–20 раз эффективнее, чем DH1. Этот штамм характеризуется низкой частотой рекомбинации и мутагенеза.

Многие из упоминающихся здесь бактериальных штаммов хранятся в коллекции культур (*E. coli* Genetic Stock Center).

3. Хранение штаммов *E. coli*

E. coli — очень удобный объект генетических исследований, условия его культивирования и хранения могут быть самыми различными. Однако эффективность трансформации во многом определяется именно этими факторами. Три метода хранения *E. coli* дают надежные результаты при получении компетентных клеток.

1. Замораживание клеток при -70°C или в жидком азоте.
2. Медленный анаэробный рост в столбиках агара.
3. Аэробный рост на чашках с агаром при комнатной температуре.

Сроки хранения *E. coli* этими методами составляют соответственно 10–20 лет, 1–2 года и несколько дней. Хранение клеток *E. coli* в 50%-ном глицерине при -20°C и на чашках или в столбиках при 4°C , как правило, не рекомендуется.

Три основных способа хранения описаны ниже. В каждом случае клетки следует рассеять штрихом на чашке с агаром и проинкубировать до появления колоний. Затем при помощи стерилизованной в пламени вольфрамовой петли собирается несколько отдельных колоний.

3.1. Замороженные клетки

Отберите несколько свежих колоний и засейте в 5 мл богатой среды, например SOB (см. табл. 6.12). Инкубируйте на качалке до тех пор, пока культура не достигнет среднепоздней логарифмической фазы роста ($1\text{--}2 \cdot 10^8$ клеток/мл). Разбавьте культуру вдвое раствором, содержащим 60% среды и 40% глицерина, разлейте по 1 мл в 2 мл полипропиленовые пробирки с завинчивающейся крышкой (или подобные), охладите во льду, быстро заморозьте в жидком азоте и храните при -70°C . Для восстановления культуры выньте пробирку из холодильника, быстро соскребите немного замороженных клеток с поверхности замерзшей культуры и положите пробирку обратно в холодильник. Не допускайте значительного нагрева и оттаивания содержимого пробирки. Перенесите замерзший кусочек культуры с клетками на поверхность чашки с агаром. После того как он растает, разотрите каплю и проинкубируйте чашку до появления отдельных колоний. Обычно готовят серию из нескольких пробирок с замороженными клетками. Одной пробиркой пользуются 10–30 раз, затем ее выбрасывают и переходят к следующей. (Титр жизнеспособных клеток падает при многократном отборе клеток из пробирки. Если при восстановлении культуры вырастает лишь несколько колоний, пробирку следует сменить.)

3.2. Столбики агара

Приготовьте среду для культивирования, например SOB, содержащую 0,8% бакто-агара. Проавтоклавируйте или поместите ненадолго в микроволновую печь для расплавления агара и разлейте по 4 мл в плотно закрывающиеся стеклянные флаконы объемом 5 мл (флаконы Bioron или сходные). Проавтоклавируйте и оставьте неплотно закрытыми на ночь для удаления конденсировавшейся влаги. С помощью стерилизованной в пламени вольфрамовой петли отберите несколько свежих индивидуальных колоний. Обожгите крышку флакона, снимите ее, быстро погрузите петлю в толщу агара и плотно закройте крышку. Храните столбики в темноте при комнатной температуре (не при 4°C).

3.3. Хранение на чашках при комнатной температуре

Нанесите клетки штрихом на чашку с агаром и проинкубируйте при 37 °С до появления колоний диаметром 1—2 мм. Храните при комнатной температуре. Если для засева жидкой культуры или пересева на другую чашку используются старые, крупные колонии, отбирать клетки лучше с их края, там, где они продолжают расти.

4. Методики трансформации

4.1. Простая методика

Методика, предложенная Манделем и Хигой, до сих пор остается в основном неизменной — отчасти благодаря ее простоте и применимости для широкого спектра штаммов *E. coli*. Если какой-либо штамм трансформируется плохо, эту методику можно видоизменить. Во-первых, выращивайте клетки в среде, содержащей 10—20 мМ $MgCl_2$, — условие, крайне важное для описанных ниже сложных методик трансформации, но не всегда полезное для данной методики. Например, добавление Mg^{2+} к среде способствует трансформации клеток DH1, но уменьшает частоту трансформации MC1061. По-видимому, это объясняется различиями в составе их клеточной оболочки. Вторая возможная модификация состоит в использовании для трансформации буферов TFB или SB2 (содержащих $MnCl_2$ и $CaCl_2$, см. табл. 10). Любой из этих буферов может увеличить эффективность трансформации штаммов, плохо трансформирующихся по простой методике. Таким образом, один-два дня дополнительной работы по сравнению буферов могут значительно улучшить результаты трансформации штамма, который подходит вам по генетическим признакам, но плохо трансформируется плазмидами.

Методика, описанная в табл. 2, проста, но применение ее несколько ограничено. В частности, ее эффективность, обычно вы-

Таблица 2. Простая методика трансформации

1. С помощью простерилизованной в пламени вольфрамовой петли отберите с чашки несколько свежих колоний диаметром 2—3 мм и диспергируйте клетки на встряхивателе в 1 мл среды¹⁾. При отборе колоний старайтесь не захватывать кусочков агара.
2. Засейте диспергированными клетками колбу Эрленмейера с культуральной средой. Обычно одной колонией засевают 10 мл среды. Объем среды должен составлять менее 10% объема колбы. Рекомендуется среда SOB²⁾ (с добавлением или без добавления Mg^{2+} в зависимости от штамма).
3. Инкубируйте культуру при 37 °С с умеренным встряхиванием³⁾ до тех пор, пока она не достигнет середины логарифмической фазы роста и не будет содержать $4-9 \cdot 10^7$ жизнеспособных клеток/мл.
4. Перенесите культуру в центрифужные пробирки (типа Falcon 2070 или подобные) и охладите во льду 10—60 мин.

Продолжение

5. Осадите клетки центрифугированием при 750—1000 g (~2000—3000 об/мин в стандартной центрифуге) 15 мин при 4 °С. Слейте надсадок и поставьте пробирки ненадолго вверх дном на бумажное полотенце, при необходимости слегка постукав по ним для удаления остатков жидкости.

6. Ресуспендируйте клетки в простом буфере для трансформации (SB)⁵⁾ (в объеме, равном 1/3 исходного объема культуры) или в стандартном буфере TFB⁵⁾ либо на встряхивателе при небольшой скорости, либо набирая и выпуская суспензию из пипетки. Проинкубируйте во льду 10—60 мин.

7. Осадите клетки центрифугированием 15 мин при 750—1000 g. Тщательно удалите надсадок (см. стадию 5).

8. Суспендируйте клетки в SB или TFB в 1/12,5 исходного объема культуры или его части, соответствующей каждой из центрифужных пробирок. Таким образом, 2,5 мл культуры концентрируются в 200 мкл SB. Именно такой объем клеток является стандартным для трансформации.

9. Разлейте клетки по 200 мкл в стеклянные или полипропиленовые пробирки размером 17×100 мм или 12×60 мм.

10. Добавьте раствор ДНК в объеме <200 мкл. Для равномерного перемешивания ДНК и клеток пробирку вращают между ладонями. Проинкубируйте во льду 10—60 мин.

11. Поместите пробирки на 90 с в водяную баню с температурой 42 °С (тепловой шок), затем охладите, быстро перенеся в лед (0 °С).

12. Добавьте 800 мкл среды и проинкубируйте при 37 °С с умеренным встряхиванием 30—60 мин⁶⁾. Рекомендуется среда SOB²⁾.

¹⁾ При трансформации клеток MC1061 жидкая и твердая среды не должны содержать Mg^{2+} . Для клеток DH1 и C600 добавьте в среду 20 мМ Mg^{2+} . Подробности — в тексте.

²⁾ См. табл. 12.

³⁾ Умеренное встряхивание достигается на роторном встряхивателе с амплитудой 1—2 см при скорости 250 об/мин или в эквивалентных условиях.

⁴⁾ $4-9 \cdot 10^7$ клеток/мл соответствуют для штаммов *rec-* $OP_{550}=0,35-0,6$, а для штаммов *rec+* $OP_{550}=0,2-0,4$.

⁵⁾ См. табл. 10.

⁶⁾ При трансфекции ДНК M13 эта стадия не нужна.

ражающаяся числом колоний, образующихся на 1 мкг ДНК pBR322, невысока (от 10^5 до 10^7), так же, как и доля компетентных клеток (обычно $10^{-3}-10^{-6}$). Последняя цифра определяет число колоний, которые в принципе могут быть образованы препаратом компетентных клеток (колониобразующий потенциал). Это проявляется в форме кривой насыщения, когда все меньшее число дополнительных колоний образуется при добавлении возрастающих количеств ДНК. Как правило, к препарату клеток добавляется менее 10 нг трансформирующей плазмидной ДНК. Эта цифра, естественно, отличается от истинного количества ДНК плазмиды, присутствующего после отжига и лигирования, так как значительная часть плазмидной ДНК может находиться в нетрансформирующей (например, линейной) форме.

4.2. Методика стандартной высокоэффективной трансформации

«Стандартная» процедура трансформации, описанная в табл. 3, является итогом систематического исследования факторов, влияющих на трансформацию *E. coli* плазмидами [15]. Ос-

Таблица 3. Стандартная методика трансформации

1. Отберите несколько свежих колоний диаметром 2—3 мм, выращенных на чашках с агаром SOB¹⁾, и суспендируйте их на встряхивателе в 1 мл среды SOB. Засейте 1 колонией 10 мл среды. Для того чтобы получить свежие колонии, лучше всего рассеять клетки на чашке штрихом из замороженного образца или свежего столбика агара за 16—20 ч до приготовления жидкой культуры.

2. Засейте клетками колбу Эрленмейера со средой SOB. Отношение объема культуры к объему колбы должно составлять от 1:10 до 1:30 (т. е. 30—100 мл на колбу объемом 1 л).

3. Проинкубируйте с умеренным встряхиванием²⁾ при 37 °С до тех пор, пока титр культуры не достигнет $4\text{--}7 \cdot 10^7$ жизнеспособных клеток/мл³⁾.

4. Перенесите культуру в полипропиленовые центрифужные пробирки объемом 50 мл (например, пробирки Falcon 2070) и охладите во льду 10—15 мин.

5. Осадите клетки центрифугированием при 750—1000 g (2000—3000 об/мин) в течение 12—15 мин при 4 °С. Тщательно удалите остатки жидкости, постучав перевернутой пробиркой по бумажному полотенцу. Оставшиеся капли можно удалить микропипеткой.

6. Суспендируйте клетки в буфере TFB⁴⁾ (1/3 исходного объема культуры) на встряхивателе при небольшой скорости. Проинкубируйте 10—15 мин во льду.

7. Осадите клетки и удалите надосадок так же, как на стадии 5.

8. Ресуспендируйте клетки в TFB (1/12,5 исходного объема культуры). При этом 2,5 мл исходной культуры сконцентрируются до 200 мкл.

9. Добавьте раствор ДМСО и ДТТ (ДиД)⁴⁾ до 3,5 об. %, то есть 7 мкл на 200 мкл суспензии клеток. ДиД добавьте в толщу суспензии и сразу размешайте, вращая пробирку между ладонями в течение нескольких секунд. Проинкубируйте 10 мин во льду.

10. Добавьте вторую порцию раствора ДМСО и ДТТ (ДиД) так же, как на стадии 9. Концентрация ДиД составит 7%. Проинкубируйте пробирки во льду 10—20 мин.

11. Разлейте пипеткой аликвоты по 210 мкл в охлажденные на льду полипропиленовые пробирки размером 17×100 мм (Falcon 2059 или подобные).

12. Добавьте раствор ДНК в объеме <20 мкл и смешайте, вращая пробирку между ладонями. Проинкубируйте пробирки во льду 20—40 мин.

13. Поместите пробирки на 90 с в водяную баню с температурой 42 °С (тепловой шок). Для остановки теплового шока перенесите пробирки в лед и охладите 2 мин.

14. Добавьте в каждую пробирку 800 мкл среды SOC¹⁾. Проинкубируйте с умеренным встряхиванием 30—60 мин при 37 °С⁵⁾.

15. Рассейте клетки на чашках с агаром, содержащим нужные для селекции трансформантов добавки.

Варианты:

1. ДМСО и ДТТ можно добавлять по отдельности. В этом случае поступите следующим образом:

9а. Добавьте ДМСО до концентрации 3,5% (по объему) (т. е. 7 мкл на 200 мкл суспензии клеток. ДиД добавьте в толщу суспензии и сразу размешайте, вращая пробирку между ладонями в течение нескольких секунд. Проинкубируйте 10 мин во льду.

9б. Добавьте раствор ДТТ до 3,5% (по объему) (т. е. 7 мкл 2,2 М ДТТ, 10 мМ ацетата калия pH 6,2 на 200 мкл суспензии клеток) и размешайте 5 с. Проинкубируйте 10 мин во льду.

10. Добавьте вторую аликвоту ДМСО. Конечная концентрация составит 7%. Проинкубируйте 5—10 мин во льду.

Продолжение

2. Раствор ДМСО+ДТТ можно добавлять одной аликвотой, т. е. сразу до 7% (по объему) (14 мкл на каждые 200 мкл смеси для трансформации). Эффективность трансформации составит 75% от получаемой при двукратном добавлении.

¹⁾ См. табл. 12.

²⁾ См. примечание 3 к табл. 2.

³⁾ Для клеток DH1 это соответствует ОП₅₅₀=0,45—0,55.

⁴⁾ См. табл. 10.

⁵⁾ При трансфекции M13 эта стадия не нужна.

новое преимущество этого метода — очень высокая эффективность трансформации и для крупных, и для релаксированных плазмид; высока в данном случае и доля компетентных клеток. При получении компетентных клеток таким способом необходимо постоянное внимание к деталям. На эффективность метода влияют различные примеси в препаратах используемых реагентов. Если тщательно готовить растворы и использовать реактивы необходимого качества, с помощью этого метода всегда можно получить необходимую для многих целей высокоэффективную трансформацию. Эффективность трансфекции репликативной формой ДНК бактериофага M13 сравнима с эффективностью трансформации плазмидами сходного размера, поэтому методика может применяться и для введения векторов M13 в хозяйские клетки.

Приведенная в табл. 3 методика содержит в сравнении с оригиналом [15] единственную модификацию: применен раствор, содержащий одновременно ДМСО и дитиотрейтол (ДТТ), так что вместо трех раз реагенты добавляются в смесь дважды. При этом эффективность трансформации штамма *E. coli* DH1 и родственных штаммов такая же или выше, чем при раздельном внесении этих реагентов. Более того, смесь ДМСО+ДТТ можно вносить одной аликвотой, при этом частота трансформации составит 75% от частоты, которая достигается при двух добавлениях. В конце таблицы кратко описана и оригинальная методика.

Если важны надежность и воспроизводимость результатов (что имеет место в большинстве случаев), существенное значение приобретает подготовка культуры *E. coli* для трансформации. Хорошо трансформирующиеся клетки можно вырастить при различных условиях, но наиболее эффективна следующая процедура. Из хранящейся при —70 °С культуры отбирают немного клеток, рассеивают их штрихом на чашке со средой SOB и инкубируют при 37 °С до тех пор, пока колонии не достигнут 2,5—3 мм в диаметре. Колонии отбирают и суспендируют в 1 мл среды SOB, засевают ими больший объем среды и инкубируют культуру на качалке при 37 °С до тех пор, пока титр ее не достигнет $5\text{--}7 \cdot 10^7$ жизнеспособных клеток/мл. Культуру переносят

в охлажденные центрифужные стаканы и используют для трансформации. Могут подойти и другие методы хранения и подготовки клеток, но ни один из них, по опыту автора, не дает таких надежных результатов. Свежие столбики, свежий пассаж культуры на чашке, клетки, медленно растущие при комнатной температуре, — все эти варианты инкубации клеток могут использоваться в опытах по трансформации, однако результаты при этом нестабильны. Клетки, полученные из столбиков или чашек, хранившихся при 4 °С, либо из суспензий, хранившихся при —20 °С в 50%-ном глицерине, обычно ненадежны. Биологические причины невоспроизводимости трансформации при таком способе хранения клеток остаются неясными. Описанная выше процедура позволяет добиться воспроизводимых результатов, однако не претендует на объяснение этих причин.

Важнейший фактор, влияющий на эффективность трансформации, — чистота используемых реагентов. В то же время относительно большие отклонения во времени инкубации на большинстве стадий в скоростях и продолжительности центрифугирования, в концентрациях компонентов вполне допустимы. Основные загрязнения, влияющие на трансформацию, — это, видимо, органические примеси в воде и продукты окисления ДМСО. Если обеспечено хорошее качество воды и ДМСО, высокая эффективность трансформации достигается легко. Критерии качества этих реагентов обсуждаются в разд. 5. Еще одна причина возможной неудачи при трансформации — загрязнения, связанные с пластиком и детергентами. Использование при трансформации стеклянной посуды может неблагоприятно повлиять на компетентность клеток. По-видимому, это связано с вредным воздействием органических соединений, загрязняющих автоклав при стерилизации пластиковых отходов, а также с неполным удалением используемых при мойке детергентов. Вот почему следует иметь комплект посуды только для трансформации. Эту посуду после работы тщательно споласкивают, автоклавируют, наполовину заполнив водой, и промывают перед работой стерильной водой или средой. Кроме того, некоторые из используемых для стерилизации мембран (например, Nalge) могут быть пропитаны смачивающими агентами, например детергентом Тритон X100. Такие фильтры перед стерилизацией TFB и культуральных сред следует 1—2 раза промыть водой.

Следующий источник загрязнений — поверхностно-активные вещества, попадающие на пластиковую посуду в процессе изготовления. Некоторые марки полипропиленовых пробирок (например, Sarsted) необходимо хорошо прополаскивать перед использованием, иначе эффективность трансформации в них окажется низкой. В приводимой методике нельзя использовать пробирки из полистирола, так как они слегка растворя-

ются в ДМСО, а растворенный материал заметно ингибирует трансформацию. Вместо полипропиленовых пробирок можно использовать стеклянные. Следует, однако, подобрать время теплового шока, так как теплопроводность стекла иная, чем полипропилена, а толщина стенок меняется в зависимости от марки пробирок.

Еще одна возможная причина неудач в опытах по трансформации связана с реактивами и экстрактами, используемыми для выращивания и приготовления клеток. Гидролизаты казеина и дрожжевые экстракты, как правило, эквивалентны. Иногда эти продукты оказываются некачественными. В частности, одна из партий дрожжевого экстракта (фирмы Oxoid) была непригодной для приготовления компетентных клеток. Обычно реактивы довольно долго сохраняют свою стабильность, но при этом они не свободны от появления загрязнений и от некоторого разложения при хранении. MES, например, разлагается при длительном хранении в сухом виде при комнатной температуре. Выяснить, какой именно реактив некачественный, можно, лишь заменяя их по очереди свежими. Ранее в состав стандартного буфера для трансформации (TFB) в качестве моновалентного катиона вводили RbCl. Однако оказалось, что его вполне можно заменить значительно более дешевым KCl [15], который и включен в рекомендованный нами буфер. Необходимо использовать KCl наивысшей чистоты, так как он присутствует в TFB в высокой концентрации. TFB весьма устойчив; готовый буфер, хранившийся при 4 °С 2 года, оказался не хуже свежеприготовленного.

При использовании стандартной методики частота трансформации приобретает нелинейный характер уже в интервале 1—5 нг ковалентно замкнутой ДНК pBR322, а все компетентные клетки в популяции насыщаются в присутствии 100—200 нг плазмидной ДНК. Нужно отметить, что при добавлении более 25 нг плазмидной ДНК становится заметной частота появления двойных трансформантов [15]. Вот почему целесообразно, чтобы количество кольцевой (способной к трансформации) ДНК в реакции трансформации не превышало 10 нг. В тех случаях, когда значительная часть плазмидной ДНК находится в неспособной к трансформации форме, количество ДНК можно повысить, не забывая, однако, что любая ДНК становится конкурентоспособной, если ее концентрация составляет 25—100 нг на 10⁸ клеток.

4.3. Трансформация колоний

Методика трансформации колоний представляет собой упрощенный вариант описанной выше сложной процедуры и основана на том наблюдении, что свежие колонии клеток можно

собрать, суспендировать в буфере для трансформации (ТФВ, табл. 10) и обработать далее по описанной выше методике. При этом нет необходимости выращивать жидкую культуру *E. coli*, что является в некоторых случаях преимуществом. Ниже приведены два варианта методики: трансформация колоний (табл. 4) и быстрая трансформация (табл. 5).

Таблица 4. Методика трансформации колоний

1. Отберите 2—4 свежие колонии¹⁾ бактерий, выращенных на чашке со средой, содержащей 10—20 мМ Mg^{2+} . Перенесите колонии в полипропиленовую пробирку (например, Falcon 2059), с 200 мкл ТФВ и энергично суспендируйте на встряхивателе. Отбирая колонии при помощи вольфрамовой петли, старайтесь собрать максимальное количество бактериальной массы и в то же время не захватить кусочков агара.
2. Проинкубируйте пробирку 15—30 мин во льду.
3. Внесите 1 мкл раствора ДМСО и ДТТ (ДиД)²⁾ в центр раствора и размешайте, несколько секунд вращая пробирку между ладонями. Проинкубируйте во льду 10—15 мин.
4. Добавьте еще 7 мкл ДиД, размешайте и проинкубируйте во льду 10—20 мин.
5. Добавьте раствор ДНК в объеме менее 20 мкл. Проинкубируйте во льду 10—40 мин.
6. Поместите раствор на 90 с в водяную баню с температурой 42 °С (тепловой шок), затем охладите 2 мин во льду.
7. Добавьте 800 мкл среды SOC³⁾. Проинкубируйте⁴⁾ при 37 °С и умеренном встряхивании 30—60 мин. Высейте бактерии на подходящую селективную среду.

Вариант

ДМСО и ДТТ можно добавлять по отдельности, как указано в табл. 3. Раствор ДМСО+ДТТ можно добавлять и одной порцией в 14 мкл.

¹⁾ Диаметр колоний должен составлять 2—4 мм. Колонии лучше собирать при комнатной температуре. Можно, вынув чашку из термостата, выдержать ее $>1/2$ часа при 20 °С либо после инкубации при 37 °С инкубировать до 3 дней при 20 °С. После того как колонии суспендированы, среда должна заметно помутнеть. Если этого не произошло, для получения плотной суспензии добавьте еще несколько колоний.

²⁾ См. табл. 10.

³⁾ См. табл. 12.

⁴⁾ При трансфекции M13 эта стадия не нужна.

⁵⁾ См. примечание 3 к табл. 2.

Таблица 5. Быстрая трансформация

1. С помощью вольфрамовой петли отберите с чашки несколько колоний (или комочек клеток), стараясь не захватывать кусочки агара.
2. Энергично диспергируйте колонии (либо на встряхивателе, либо многократно набирая суспензию клеток в пипетку) в 200 мкл стандартного буфера для трансформации (ТФВ¹⁾).
3. Проинкубируйте 10 мин во льду.
4. Добавьте ДНК (10—200 нг) в объеме <20 мкл, размешайте и проинкубируйте 10 мин во льду.
5. Прогрейте клетки 90 с при 37—42 °С (тепловой шок).
6. Засейте подходящую селективную среду несколькими фракциями (например, 1, 5 и 25%) реакционной смеси.

¹⁾ См. табл. 10.

Эффективность приведенной в табл. 4 методики трансформации колоний составляет от $1 \cdot 10^7$ до $2 \cdot 10^8$ колоний на мкг ДНК pBR. Для нее необходима лишь чашка с относительно свежими клетками. Эта методика удобна для субклонирования и конструирования плазмид. Клетки можно посеять на богатой среде, содержащей 10—20 мМ Mg^{2+} , вырастить колонии в течение ночи при 37 °С и инкубировать их далее при комнатной температуре до начала эксперимента (до 2 сут). Для получения надежной трансформации необходимо выполнить два главных условия. Диаметр колоний должен составлять 3—5 мм. Для каждой реакции трансформации (объем смеси 200 мкл) необходимо 2—4 колонии (в зависимости от размера). Кроме того, при отборе колоний важно не захватывать вместе с бактериями частицы агара, так как агар мешает трансформации. Удобно использовать вольфрамовую петлю, например петлю Йоргенсона (фирма Scientific Products) или эквивалентную. Хорошие результаты получаются тогда, когда удается собрать достаточную массу бактерий, не загрязнив их кусочками агара. Основным недостаток данного метода получения компетентных клеток состоит в том, что уровень насыщения клеток в этом случае оказывается ниже, чем сходной популяции, полученной из жидкой культуры. Другими словами, доля компетентных клеток в такой популяции ниже, чем в популяции, полученной из жидкой культуры, хотя частота трансформации в этих случаях сравнима. Метод трансформации колоний нецелесообразно применять в тех случаях, когда стоит задача получить максимальное число колоний из данного количества ДНК, например при клонировании кДНК или «спасении» интегрированных плазмид.

Приведенная в табл. 5 процедура быстрой трансформации представляет собой упрощенную методику трансформации колоний. Клетки диспергируют в ТФВ, добавляя ДНК и рассеивают (иногда даже без теплового шока). Это очень быстрая, но малоэффективная методика ($\sim 10^3$ — 10^4 колоний/мкг). Ее используют для быстрого введения уже клонированных плазмид в *E. coli*. Вместо того чтобы хранить в замороженном виде или на столбиках агара клетки *E. coli*, несущие плазмиды, эти плазмиды можно сохранить в форме ДНК. Если какая-либо из плазмид необходима для работы, ее можно быстро ввести в *E. coli* и размножить. При этом нет необходимости хранить и пересевать большое число трансформированных штаммов, а плазмиды не могут потеряться в результате гибели или загрязнения клеток. Кроме того, при этом достигается экономия места. Если в лаборатории имеются сотни рекомбинантных плазмид, их хранение в форме бактериальных культур становится тяжелой задачей. По опыту автора, длительное хранение плазмид в виде ДНК удобно и надежно. В заморожен-

ном состоянии хранятся лишь нетрансформированные клетки *E. coli*; часто используемые трансформированные штаммы можно держать в столбиках агара, а остальные плазмиды — в виде ДНК при -20°C .

4.4. Хранение компетентных клеток в замороженном состоянии

Компетентные для трансформации клетки *E. coli* можно хранить в этом состоянии длительное время при температуре -70°C или ниже. Существует несколько модификаций процедуры трансформации, приспособленных для приготовления и использования замороженных компетентных клеток. Основное их преимущество в том, что можно сразу приготовить большое количество компетентных клеток и расходовать их по мере надобности в течение многих месяцев. Со временем эффективность трансформации таких клеток уменьшается. Доля жизнеспособных и компетентных клеток в препарате после оттаивания обычно ниже, чем в свежем. Поэтому замороженные компетентные клетки нельзя рекомендовать для тех случаев, когда необходимы наивысшая частота трансформации и наибольший колониеобразующий потенциал, например, для получения библиотек кДНК из ограниченного количества исходной ДНК.

Методы приготовления замороженных компетентных клеток приведены в табл. 6—8. Во всех методиках в качестве стаби-

Таблица 6. Трансформация с использованием замороженных клеток (методика 1)

А. Приготовление клеток

1. С помощью простерилизованной в пламени горелки вольфрамовой петли отберите с чашки несколько свежих колоний диаметром 2—3 мм и суспендируйте клетки на встряхивателе в 1 мл среды. При отборе клеток старайтесь не захватить кусочков агара.

2. Засейте суспендированными клетками колбу Эрленмейера со средой. Одной колонией засевают 10 мл среды. Объем среды должен составлять менее 10% объема колбы. Рекомендуется среда SOB (в зависимости от штамма с добавлением или без добавления Mg^{2+}).

3. Прониккубируйте культуру при 37°C и умеренном встряхивании до тех пор, пока она не достигнет середины логарифмической фазы роста и не будет содержать $4-9 \cdot 10^7$ жизнеспособных клеток/мл.

4. Перенесите культуру в центрифужные пробирки (например, 50 мл полипропиленовые пробирки Falcon 2070) и охладите во льду 10—60 мин.

5. Осадите клетки центрифугированием при $750-1000\text{ g}$ ($\sim 2000-3000$ об/мин в стандартной центрифуге) 15 мин при 4°C . Слейте надсадок и поставьте пробирки ненадолго вверх дном на бумажное полотенце, при необходимости слегка постучав по ним для удаления остатков жидкости.

6. Ресуспендируйте клетки в буфере для замораживания (FB)¹⁾ в объеме, равном $1/3$ объема исходного объема культуры, либо на встряхивателе при небольшой скорости, либо набирая и выпуская суспензию из пипетки. Прониккубируйте 10—60 мин во льду.

Продолжение

7. Осадите клетки центрифугированием 15 мин при $750-1000\text{ g}$. Тщательно удалите надсадок (см. стадию 5).

8. Суспендируйте клетки в FB в $1/12.5$ исходного объема культуры. Таким образом, 2,5 мл культуры концентрируются в 200 мкл FB. Такой объем является стандартным для трансформации.

9. Разлейте клетки по 200 мкл в 2 мл полипропиленовые пробирки с закручивающейся крышкой или в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки.

10. Быстро заморозьте клетки в смеси сухого льда с этанолом или в жидком азоте и оставьте там на несколько минут.

11. Храните пробирки при -70°C или в жидком азоте.

Б. Использование замороженных клеток

1. Достаньте пробирку из холодильника и выдержите на воздухе при комнатной температуре. Как только суспензия клеток оттаит, перенесите пробирку в лед. (Если клетки были заморожены в большом объеме, разлейте их в отдельные пробирки по 200 мкл).

2. Добавьте раствор ДНК в объеме <20 мкл. Размешайте ДНК, вращая пробирку между ладонями.

3. Прониккубируйте пробирку во льду 10—60 мин.

4. Поместите пробирку на водяную баню с температурой 42°C на 90 с (тепловой шок), затем быстро охладите до 0°C (во льду).

5. Добавьте 800 мкл среды SOC²⁾ и прониккубируйте при 37°C с умеренным встряхиванием 30—60 мин³⁾.

¹⁾ Состав буфера FB приведен в табл. 10.

²⁾ Состав среды SOC приведен в табл. 12.

³⁾ При трансфекции M13 эта стадия не нужна.

Таблица 7. Трансформация с использованием замороженных клеток (методика 2)

А. Приготовление клеток

1. С помощью стерильной вольфрамовой петли отберите несколько свежих колоний диаметром 2—3 мм, выращенных на чашках со средой SOB, и диспергируйте их на встряхивателе в 1 мл среды SOB. Для получения свежих колоний лучше всего рассеять клетки на чашке штрихом из замороженного образца или свежего столбика агара за 16—20 час до приготовления жидкой культуры.

2. Засейте клетками колбу Эрленмейера со средой SOB. Одной колонией засевают 10 мл среды. Отношение объема культуры к объему колбы должно составлять от 1:10 до 1:30 (т. е. 30—100 мл на колбу объемом 1 л).

3. Прониккубируйте при 37°C с умеренным встряхиванием до тех пор, пока титр культуры не достигнет $6-9 \cdot 10^7$ жизнеспособных клеток/мл.

4. Перенесите культуру в полипропиленовые центрифужные пробирки объемом 50 мл (например, пробирки Falcon 2070) и охладите во льду 10—15 мин.

5. Осадите клетки центрифугированием при $750-1000\text{ g}$ (2000—3000 об/мин) в течение 12—15 мин при 4°C . Тщательно удалите остатки жидкости, постучав перевернутой пробиркой по бумажному полотенцу. Оставшиеся капли можно удалить микропипеткой.

6. Суспендируйте клетки в буфере для замораживания (FSB)¹⁾ ($1/3$ исходного объема культуры) на встряхивателе при небольшой скорости. Прониккубируйте 10—15 мин во льду.

7. Осадите клетки и удалите надсадок так же, как на стадии 5.

8. Ресуспендируйте клетки в FSB ($1/12.5$ исходного объема культуры). При этом 2,5 мл исходной культуры сконцентрируется до 200 мкл.

Продолжение

9. Добавьте ДМСО до 3,5% (по объему), т. е. 7 мкл на 200 мкл суспензии клеток. Добавляйте ДМСО в центр суспензии и сразу перемешивайте, вращая пробирку 5—10 с. Проинкубируйте 5 мин во льду.

10. Добавьте вторую aliquоту ДМСО до конечной концентрации 7%. Проинкубируйте во льду 10—15 мин. (В этой методике ДТТ не используется.)

11. Разлейте по 210 мкл в охлажденные полипропиленовые пробирки с завинчивающимися крышками или в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки.

12. Быстро заморозьте клетки в смеси сухого льда с этанолом или в жидком азоте и оставьте там на несколько минут.

13. Храните пробирки при -70°C или в жидком азоте.

Б. Использование замороженных клеток

1. Достаньте пробирку из холодильника и выдержите на воздухе при комнатной температуре. Как только суспензия клеток оттает, перенесите пробирку в лед. (Если клетки были заморожены в большом объеме, разлейте их в отдельные пробирки по 200 мкл.)

2. Добавьте раствор ДНК в объеме <20 мкл. Размешайте ДНК, вращая пробирку между ладонями.

3. Проинкубируйте пробирку во льду 10—60 мин.

4. Поместите пробирку в водяную баню с температурой 42°C на 90 с (тепловой шок), затем быстро охладите до 0°C (во льду).

5. Добавьте 800 мкл среды SOC и проинкубируйте при 37°C с умеренным встряхиванием 30—60 мин.

Таблица 8. Трансформация с использованием замороженных клеток (методика 3)

А. Приготовление клеток

1. С помощью стерильной вольфрамовой петли отберите несколько свежих колоний диаметром 2—3 мм, выращенных на чашке со средой SOB, и диспергируйте их на встряхивателе в 1 мл среды SOB. Для получения отдельных колоний лучше всего рассеять клетки на чашке штрихом из замороженного образца или свежего столбика агара за 16—20 ч до приготовления жидкой культуры.

2. Засейте клетками колбу Эрленмейера со средой SOB или Psi¹⁾. Отношение объема культуры к объему колбы должно составлять от 1:10 до 1:30 (т. е. 30—100 мл на колбу объемом 1 л).

3. Инкубируйте с умеренным встряхиванием при 37°C до тех пор, пока титр культуры не достигнет $4\text{--}7 \cdot 10^7$ жизнеспособных клеток/мл.

4. Перенесите культуру в полипропиленовые пробирки объемом 50 мл (например, пробирки Falcon 2070) и охладите во льду 10—15 мин.

5. Осадите клетки центрифугированием при 750—1000 g (2000—3000 об/мин) в течение 12—15 мин при 4°C . Тщательно удалите остатки жидкости, постукав перевернутой пробиркой по бумажному полотенцу. Оставшиеся капли можно удалить микропипеткой.

6. Суспендируйте клетки на встряхивателе при небольшой скорости в объеме буфера RF1²⁾, составляющем $\frac{1}{3}$ от собранного объема. Проинкубируйте клетки во льду 15 мин (DH1 или JM101) или 2 часа (HB101).

7. Осадите клетки так, как указано на стадии 5 табл. 6.3.

8. Ресуспендируйте клетки в RF2 ($\frac{1}{12,5}$ исходного объема). Проинкубируйте во льду 15 мин.

9. Разлейте клетки в охлажденные пробирки с завинчивающимися крышками или в 1,5 мл микроцентрифужные пробирки.

10. Быстро заморозьте в смеси сухого льда с этанолом или в жидком азоте и храните при -70°C .

Продолжение

Б. Использование замороженных клеток

1. Достаньте пробирки из холодильника и выдержите на воздухе при комнатной температуре. Как только суспензия клеток оттает, перенесите пробирки в лед. (Если клетки были заморожены в большом объеме, разлейте их в отдельные пробирки по 200 мкл.)

2. Добавьте раствор ДНК в объеме <20 мкл. Размешайте, вращая пробирку между ладонями.

3. Проинкубируйте пробирки во льду 10—60 мин.

4. Поместите пробирки в водяную баню с температурой 42°C на 90 с (тепловой шок), затем быстро охладите до 0°C (на льду).

5. Добавьте 800 мкл среды SOC и проинкубируйте при 37°C с умеренным встряхиванием 30—60 мин.

¹⁾ Составы сред приведены в табл. 12.

²⁾ Составы RF1 и RF2 приведены в табл. 10.

лизирующего агента применен глицерин. Первый метод — вариант стандартной методики трансформации с использованием CaCl_2 . Этот метод самый простой, но в большинстве случаев наименее эффективный. Некоторые штаммы, однако (например, штамм MC1061), трансформируются им лучше, чем методами с использованием более сложных буферов.

Второй метод представляет собой модификацию стандартной трансформации, которая дает возможность сохранять компетентные клетки в замороженном виде. Для этого в буфер добавлен глицерин, а 2[N-морфолино]-этансульфоновая кислота (MES) заменена ацетатом калия. Как MES, так и ДТТ мешают при подготовке и использовании замороженных компетентных клеток. Оптимальная плотность клеток, которые предстоит заморозить, как правило, несколько выше, чем клеток, непосредственно используемых для трансформации. Плотность DH1, например, должна быть $6\text{--}9 \cdot 10^7$ жизнеспособных клеток/мл, а не $5\text{--}7 \cdot 10^7$, как предусмотрено стандартной методикой.

Третья методика (табл. 8) разработана Симанисом (личное сообщение). Компетентные клетки, приготовленные по этой методике, обеспечивают эффективность трансформации такую же, как приготовленные по методике из табл. 7. Преимущество методики Симаниса в том, что она не требует ДМСО и позволяет отказаться от этого реактива, если есть сомнения в его качестве. Для некоторых штаммов такой метод может подойти лучше, чем предыдущие.

4.5. Трансформация $\chi 1776$

Описанный здесь метод разработан в то время, когда практически во всех экспериментах с рекомбинантной ДНК в качестве бактерии-хозяина использовали штаммы с пониженной

Таблица 9. Методика трансформации $\chi 1776$

1. С помощью стерильной вольфрамовой петли отберите несколько колоний диаметром 2—3 мм, выращенных на чашке со средой Хб¹⁾. Осторожно диспергируйте их на встряхивателе в 1 мл среды Хб.

2. Засейте 25—100 мл среды Хб в колбе объемом 300 мл из расчета: 1 колония на 10 мл культуральной среды. На одну реакцию трансформации требуется 5 мл культуры.

3. Инкубируйте при 37 °С с интенсивным встряхиванием до тех пор, пока титр культуры не достигнет $5\text{--}7 \cdot 10^7$ жизнеспособных клеток/мл²⁾. Если клетки растут хорошо, удвоение плотности происходит за 38—45 мин.

4. Перенесите культуру в полипропиленовые центрифужные пробирки объемом 50 мл (Falcon 2070 или эквивалентные) и охладите 10—15 мин на льду.

5. Осадите клетки центрифугированием в течение 12—15 мин при 750—1000 g (2000—3000 об/мин) и 4 °С.

6. Слейте надосадок и удалите остатки жидкости, постучав перевернутой пробиркой по стопке бумажных полотенец.

7. Суспендируйте клетки в буфере XFB ($1/3$ исходного объема культуры). Диспергируйте осадок клеток либо на встряхивателе при малой скорости, либо вращая пробирку между ладонями. Проинкубируйте 5—10 мин на льду.

8. Осадите клетки так же, как на стадиях 5 и 6.

9. Ресуспендируйте клетки в XFB ($1/25$ исходного объема культуры). При этом каждые 5 мл культуры концентрируются до 200 мкл, т. е. до объема, необходимого для одной реакции трансформации. Проинкубируйте на льду 10—15 мин.

10. На каждые 200 мкл клеток добавьте 7 мкл ДМСО, внося его в центр суспензии и быстро размешивая. Проинкубируйте клетки на льду 5—25 мин, время от времени перемешивая³⁾.

11. Разлейте клетки по 200 мкл в полипропиленовые пробирки 12.75 мм (Falcon 2063 или эквивалентные).

12. Добавьте ДНК в объеме 1—10 мкл. Проинкубируйте на льду 10—30 мин.

13. Поместите пробирки на 100 с в баню с температурой -70 °С. Суспензия должна замерзнуть. Используйте для бани смесь сухого льда с изопропанолом. Выньте пробирки из охлаждающей смеси и выдержите при комнатной температуре. Как только суспензия растает, перенесите пробирки на лед⁴⁾.

14. Проинкубируйте 5—10 мин.

15. Поместите пробирки на 60 с в водяную баню с температурой 42 °С (тепловой шок). Если используются пробирки другого размера и из другого материала, оптимальное время теплового шока следует подобрать экспериментально. Поместите пробирки в лед на 2 мин.

16. Добавьте 80 мкл среды Хб и проинкубируйте 1 час при 37 °С без встряхивания. Рассейте на чашки со средой Хб, содержащей необходимые для селекции плазмид компоненты.

¹⁾ Состав среды Хб приведен в табл. 12.

²⁾ Это соответствует $OD_{550}=0.2$.

³⁾ В этой методике конечная концентрация ДМСО составляет 3,5% (по объему). В отличие от методики, приведенной в табл. 6.3, ДМСО добавляется один раз, а ДТТ не используется.

⁴⁾ Компетентные клетки $\chi 1776$ можно хранить длительное время при -70 °С. Для этого, не добавляя ДНК (пропустите стадию 12), заморозьте клетки и поместите в холодильник на -70 °С. После того как клетки оттают и будут помещены в лед, добавьте ДНК.

Таблица 10. Подготовка буферов для трансформации

А. Стандартный буфер для трансформации (TFB)

Компонент	Количество в литре	Конечная концентрация
KCl (особо чистый)	7,4 г	100 мМ
MnCl ₂ ·4H ₂ O	8,9 г	45 мМ
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,5 г	10 мМ
NaCoCl ₃ ¹⁾	0,8 г	3 мМ
K-MES	20 мл 0,5 М запасного раствора (pH 6,3)	10 мМ
pH рабочего раствора	6,20±0,10	

Приготовление: 0,5 М раствор MES (2 [N-морфоллино] этансульфоновой кислоты) оттитруйте до pH 6,3 концентрированным KOH, простерилизуйте фильтрованием через мембрану с порами 0,22 мкм и храните в аликвотах при -20 °С. 10 мМ раствор K-MES приготовьте из запасного раствора, используя воду максимально возможной чистоты. Добавьте соли (в сухом виде) и профильтруйте раствор через предварительно промытую мембрану с порами 0,22 мкм. Разлейте по стерильным флаконам и храните при 4 °С (TFB хранится более года).

Б. Буфер для замораживания клеток (FSB)

Компонент	Количество в литре	Конечная концентрация
KCl	7,4 г	100 мМ
MnCl ₂ ·4H ₂ O	8,9 г	45 мМ
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,5 г	10 мМ
NaCoCl ₃ ¹⁾	0,8 г	3 мМ
Ацетат калия	10 мл 1 М запасного раствора (pH 7,5)	10 мМ
Перегнаный глицерин	100 г	10% (вес/объем)
pH рабочего раствора	6,20±0,10	

Приготовление: оттитруйте 1 М раствор ацетата калия до pH 7,5 KOH, простерилизуйте через мембрану с порами 0,22 мкм и храните в замороженном состоянии. Используя этот раствор, приготовьте 10 мМ раствор ацетата калия с 10% глицерина на максимально чистой воде. Добавьте соли (в сухом виде), доведите (при необходимости) до pH 6,4 0,1 N HCl. Повышать pH при помощи основания не следует. (pH будет изменяться в течение 1—2 дней и установится равным 6,1—6,2.) Простерилизуйте раствор фильтрованием через промытую мембрану с порами 0,22 мкм и храните при 4 °С.

Продолжение

В. Простой буфер для трансформации (SB)

Компонент	Количество в литре	Конечная концентрация
SB		
KCl	7,4 г	100 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	7,5 г	50 mM
K-MES	20 мл 0,5 М запасного раствора (pH 6,3)	10 mM
pH 6,2		
SB2		
KCl	7,4 г	100 mM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	8,9 г	45 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,5 г	10 mM
K-MES	20 мл 0,5 М запасного раствора (pH 6,3)	10 mM
pH 6,2		

Г. Простой буфер для замораживания клеток (FB)

Компонент	Количество в литре	Конечная концентрация
KCl	7,4 г	100 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	7,5 г	50 mM
Перегнаный глицерин	100 г	10% (вес/объем)
Ацетат калия	10 мл 1 М запасного раствора (pH 7,5)	10 mM
pH 6,2		

Приготовление SB и FB: к 10 mM буферному компоненту, приготовленному на максимально чистой воде так, как указано выше, добавьте CaCl₂. Буфер не обязателен, но улучшает надежность и воспроизводимость трансформации. pH рабочего раствора должен быть 6,2. Вместо ацетата калия для FB можно использовать 10 mM MOPS pH 6,5.

Д. Буфер трансформации χ 1776 (XFB)

Компонент	Количество в литре	Конечная концентрация
RbCl	12 г	100 mM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	8,9 г	45 mM
Ацетат калия	35 мл 1 М запасного раствора (pH 7,5)	35 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,5 г	10 mM
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,0 г	5 mM
LiCl	20 мг	0,5 mM
Сахароза (особо чистая)	150 г	15% (вес/объем)
pH 5,80		

Продолжение

Приготовление: все компоненты, кроме MnCl₂ и RbCl, растворите в воде максимальной чистоты. Оттитруйте до pH 5,92. Добавьте MnCl₂ и RbCl в сухом виде, после чего pH должен понизиться до 5,80±0,02. Лучше избегать последующего подведения pH. Профильтруйте через промытую мембрану с порами 0,22 мкм и храните при -20°C.

Е. RF1

Компонент	Количество в литре	Конечная концентрация
RbCl	12 г	100 mM
MnCl ₂ ·4H ₂ O	9,9 г	50 mM
Ацетат калия	30 мл 1 М запасного раствора (pH 7,5)	30 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1,5 г	10 mM
Глицерин (pH 5,80)	150 г	15% (вес/объем)

pH доведите 0,2 М уксусной кислотой. Простерилизуйте через промытую мембрану с порами 0,22 мкм.

Ж. RF2

Компонент	Количество в литре	Конечная концентрация
MOPS	20 мл 0,5 М запасного раствора (pH 6,8)	10 mM
RbCl	1,2 г	10 mM
CaCl ₂ ·2H ₂ O	11 г	75 mM
Глицерин	150 г	15% (вес/объем)
pH — 6,8		

pH доведите NaOH и простерилизуйте фильтрованием через промытую мембрану с порами 0,22 мкм.

З. Раствор ДМСО и ДТТ (ДиД)

Компонент	Количество в конечном объеме 10 мл	Конечная концентрация
ДТТ	1,53 г	1 М
ДМСО	9 мл	90 об. %
Ацетат калия	100 мкл 1 М запасного раствора (pH 7,5)	10 mM

И. Раствор ДТТ

Компонент	Количество в литре	Конечная концентрация
ДТТ	3,3 г	2,2 М
Вода	7 мл	
Ацетат калия	100 мкл 1 М запасного раствора (pH 7,5)	10 М

Приготовление: Объедините компоненты. Добавьте растворитель до конечного объема 10 мл. Водный раствор ДТТ простерилизуйте фильтрованием через мембрану с порами 0,22 мкм при помощи шприца на 10 мл. Если раствор ацетата калия стерилен, раствор ДТТ стерилизовать фильтрованием не нужно. При необходимости, однако, его можно профильтровать через мембрану Millipore Millex SR, предназначенную для работы с органическими растворителями. Разлейте растворы на небольшие порции и храните замороженными. Каждую порцию можно замораживать и снова размораживать несколько раз. Вместо ацетата калия в растворах можно применять 10 мМ MES, pH 6,2.

¹⁾ NaCoCl_2 — трихлорид гексаминокобальта (III).

жизнеспособностью. Штамм-хозяин для рекомбинантных плазмид *E. coli* $\chi 1776$, сконструированный Кертиссом с соавт. [19], характеризуется высокой чувствительностью к детергентам и желчным солям и, кроме того, обладает специфическими аутокотрофными потребностями. Приведенная в табл. 9 методика позволяет трансформировать $\chi 1776$ с эффективностью $1-2 \cdot 10^8$ трансформантов/мкг pBR322, при этом 10—12% клеток в препарате компетентны для трансформации. Данная методика приводится здесь по нескольким причинам. Во-первых, штамм $\chi 1776$ по-прежнему используется при проведении некоторых экспериментов, например для клонирования генов токсинов. Во-вторых, клеточная оболочка $\chi 1776$ отличается от оболочки других штаммов. Возможно, что другие штаммы *E. coli*, оболочка которых изменена сходным образом, могут также эффективно трансформироваться этим методом. Вот почему, если какой-либо штамм плохо трансформируется приведенными выше методами, следует испытать методику трансформации $\chi 1776$.

Описанная здесь методика сходна со стандартной методикой трансформации и в действительности предшествовала ей [15]. Основная ее особенность — применение стадии быстрого замораживания и оттаивания клеток, суспендированных в буфере для трансформации (табл. 10). Эта стадия эффективна только для $\chi 1776$, что связано, по-видимому, с особенностями строения оболочки этих клеток.

Клетки $\chi 1776$ весьма чувствительны к детергентам, поэтому предназначенную для трансформации посуду нельзя мыть с их использованием. Процедуру трансформации лучше всего проводить в пластиковых пробирках однократного применения. Штамм $\chi 1776$ быстро гибнет на чашках и в столбиках агара, поэтому хранить его следует в замороженном виде. Для выращивания $\chi 1776$ наилучшей оказалась среда Хб (см. табл. 12). Во всех случаях для выделения плазмидной ДНК и для приготовления компетентных клеток нужно пользоваться именно этой средой и проводить инкубацию при интенсивном встряхивании. Замороженные препараты компетентных клеток $\chi 1776$ можно хранить при -70°C . Для этого после стадии быстрого замораживания клетки не оттаивают, а сохраняют при -70°C . Перед использованием их размораживают и продолжают трансформацию далее по методике. В этом случае, естественно, ДНК добавляют после стадии замораживания — оттаивания.

5. Реактивы

Для приготовления компетентных клеток *E. coli* используются химически чистые (reagent grade) или особо чистые химикаты. Если частота трансформации оказывается неудовлетворительной, то компоненты следует заменять поодиночке, что-

Таблица 11. Некоторые фирмы — изготовители реагентов¹

Вещество	Изготовитель	№ по каталогу
KCl	Alpha, Danvers, Mass. Fluka, Hauppauge, NY	87626 60130
MnCl ₂ ·4H ₂ O	Aldrich, Milwaukee, WI MCB, Cincinnati, OH	20,409-9 MXO185
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Aldrich	20,373-4
NaCoCl ₂	Fisher Alpha	C79 23144
MES	Aldrich Research Organics, Cleveland, OH	20,309-2 0113M
DMCO (DMSO)	Sigma, St. Louis, MO Fluka	M8250 41640
ДТТ (DTT)	Mallinkrodt	5507
Ацетат калия	MCB, Omnisolve	MX1456
Перегнаный глицерин	Calbiochem, La Jolla, CA Aldrich	233155 24,038-9
	BRL, Gaithersburg, MD	5514UA
	Alpha	13797

¹⁾ Продукция приведенных фирм дает стабильно высокие результаты в лаборатории автора. Из этого, однако, не следует, что продукция других поставщиков в результате проверки оказалась неудовлетворительной.

Продолжение

A. SOB

Бакто-триптон	2%
Дрожжевой экстракт	0,5%
NaCl	10 мМ
KCl	2,5 мМ
MgCl ₂	10 мМ
MgSO ₄	10 мМ

SOC

Среда SOC идентична среде SOB, но содержит дополнительно 20 мМ глюкозы.

Приготовление сред SOB и SOC

Растворите триптон, дрожжевой экстракт, NaCl и KCl в воде максимальной возможной чистоты и проавтоклавируйте 30—40 мин. Раствором можно пользоваться в течение 2—3 нед. Приготовьте 2 М раствор Mg²⁺, содержащий 1 М MgCl₂ и 1 М MgSO₄. Простерилизуйте фильтрованием через мембрану с порами 0,22 мкм. Аналогично приготовьте 2 М раствор глюкозы и храните его при —20 °С. Перед использованием добавьте в среду Mg²⁺ (и глюкозу для среды SOC) и простерилизуйте фильтрованием. pH раствора 6,8—7,0.

Б. Х-бульон (Хb)

Бакто-триптон	2,5%
Дрожжевой экстракт	0,75%
MgSO ₄	20 мМ
Трис pH 7,5	50 мМ
Диаминопимелиновая кислота (ДАП)	100 мкг/мл
Тимидин	50 мкг/мл

Приготовление

Растворите триптон и дрожжевой экстракт в максимально чистой воде. Проавтоклавируйте 30—40 мин. Приготовьте раствор 2 М MgSO₄, 2 М трис pH 7,5 и 100×раствор, содержащий ДАП (1 мг/мл) и тимидин (0,5 мг/мл). Простерилизуйте фильтрованием через мембрану с порами 0,22 мкм. Перед использованием добавьте к неполной среде остальные реагенты.

В. Среда LB

Бакто-триптон	1%
Дрожжевой экстракт	0,5%
NaCl	1%

Среда LM¹⁾

Бакто-триптон	1%
Дрожжевой экстракт	0,5%
NaCl	10 мМ
MgCl ₂	10 мМ

Г. Среда NZY

NZ амин	1%
Дрожжевой экстракт	0,5%
NaCl	0,5%
MgSO ₄	10 мМ

Д. Среда Psi

Бакто-триптон	2%
Дрожжевой экстракт	0,5%
MgSO ₄	20 мМ
NaCl	10 мМ
KCl	5 мМ
pH 7,6	
Доведите КОН	

¹⁾ LM в описанных здесь методиках используется для селекции на твердых средах. Твердая среда SOB применяется главным образом для получения колоний, идущих на приготовление компетентных клеток.

бы выяснить, какой из них содержит ингибирующую примесь. Поставщики реактивов, используемых автором, перечислены в табл. 11, что дает возможность исследователю сравнить применяемые им реагенты с теми, качество которых проверено опытом.

Проблема чистоты реактивов относится в первую очередь к высокоэффективным методикам с применением органических растворителей. Простые методики значительно менее чувствительны к загрязнениям. Как правило, узким местом в высокоэффективных методиках является низкое качество воды и ДМСО. Этот вопрос обсуждается ниже. Другие реагенты, качество которых может влиять на результаты, — это MES, глицерин (для методик с замораживанием) и дитиотрейтол. Единственный путь поиска некачественного реактива или материала состоит в поочередной замене компонентов. Возможные причины неудач в опытах по трансформации обсуждались в разд. 4.2.

Загрязнение воды может привести к непредсказуемым результатам. В некоторых регионах для приготовления TFB можно использовать водопроводную воду, тогда как в других местах даже дважды дистиллированная вода дает плохие результаты. Самую надежную очистку воды можно провести при помощи системы обратного осмоса (Millipore corp.), эффективно удаляющей органические загрязнения. Пригодность для трансформации полученной с помощью этой системы воды падает по мере насыщения патрона, удаляющего органические примеси, даже если проводимость воды остается очень низкой. Тот факт, что дистиллированная вода иногда оказывается непригодной, можно объяснить наличием в ней ингибирующих трансформацию примесей, близких по летучести к воде. Этот эффект наблюдается только для методик с применением органических растворителей, что указывает на взаимодействие последних с органическими примесями в воде, в результате которого образуются вещества, неблагоприятно влияющие на трансформацию. Для удаления предполагаемых загрязнений

Таблица 13. Очистка воды

1. Колбу Эрленмейера объемом 2—4 л тщательно прополощите водой.
2. Заполните колбу водой до половины. Пригодна любая вода — водопроводная, деионизованная, дистиллированная или очищенная на системе Mill Q.
3. Добавьте активированный уголь 100—325 меш (1% по массе в воде).
4. Поставьте на магнитную мешалку и перемешивайте 1—2 дня. Колбу можно закрыть неплотно алюминиевой фольгой или небольшим стаканчиком.
5. Профильтруйте воду через бумажный фильтр для удаления угля. Полученную воду можно использовать для приготовления буферов для трансформации и т. п.

полезно обрабатывать воду активированным углем. После такой обработки на совершенно непригодной до этого воде можно приготовить прекрасные растворы для трансформации. Если высокоэффективной трансформации добиться не удастся, попробуйте очистить воду этим методом (приведен в табл. 13).

ДМСО подвергается окислению с образованием диметилсульфона и диметилсульфида, а диметилсульфид — это мощный ингибитор трансформации. По-видимому, именно этим объясняется важность высокого качества ДМСО, а также тот факт, что хороший ДМСО при хранении рано или поздно становится непригодным. О качестве ДМСО судят по увеличению частоты трансформации, которое имеет место при его добавлении. Частота трансформации в присутствии ДМСО должна быть в 10—20 раз выше, чем без него. Хранить ДМСО можно различными способами. Во-первых, можно подобрать фирму, которая поставляет качественный перегнанный, спектрально чистый ДМСО, приобретать его небольшими порциями и расфасовывать по небольшим полипропиленовым пробиркам. Каждую пробирку заполняют ДМСО доверху и хранят при -20 или -70°C . Размороженную пробирку используют в течение 1 дня и выбрасывают. При использовании раствора ДМСО + ДТТ необходимо разделить его на аликвоты так, чтобы каждая пробирка подвергалась замораживанию и оттаиванию не более 5 раз. Хранение при -70°C может затормозить окисление. Другой способ (его можно применять в сочетании с первым) заключается в том, что перед применением ДМСО через него пропускают газообразный азот в течение 30—60 мин. При этом, по-видимому, происходит удаление диметилсульфида и пригодность ДМСО для работы восстанавливается.

6. Оценка результатов трансформации

Несколько приводимых ниже стандартных контролей позволяют достаточно полно оценить ход и результаты трансформации.

6.1. Фаза роста клеток

Максимальная эффективность трансформации достигается тогда, когда используемые клетки находятся на среднепоздней стадии логарифмического роста. Пока собранная культура охлаждается во льду, определите в ней титр жизнеспособных клеток. Сделать это можно, разведя 10 мкл культуры в 1 мл среды, 10 мкл этого разведения (в 10^2 раз) в 1 мл среды (разведение в 10^4 раз) и рассеяв 10 мкл этого разведения на чашке с полноценной агаризованной средой без антибиотиков. Общее разведение клеток — 10^6 раз, так что 50 колоний на чашке будут соответствовать титру $5 \cdot 10^7$ клеток/мл. Для большинства штаммов *E. coli* титр клеток должен находиться в пределах $4 \cdot 10^7$ — $8 \cdot 10^7$ клеток/мл. Если титр клеток значительно отличается от этой цифры, эффективность трансформации может оказаться низкой. Обычно титр клеток оценивают по оптической плотности ОП₅₅₀ (в действительности представляющей собой светорассеяние) при помощи спектрофотометра. Для каждого прибора необходимо определить соотношение между оптической плотностью и титром жизнеспособных клеток в культуре, так как для спектрофотометров разного типа (и разных штаммов *E. coli*) это соотношение меняется.

6.2. Частота трансформации

Частоту трансформации (или эффективность трансформации, ЭТ) определяют по стандартной ДНК (например, pBR322), добавляемой в количествах, значительно меньших, чем насыщающие. Эта величина определяет, насколько эффективно плазмида проникает и «устраивается» в индивидуальной компетентной клетке. При высокоэффективной методике для каждой реакции трансформации берут 10—100 пг ДНК pBR322. Аликвоты реакционной смеси рассеивают на чашках и определяют эффективность трансформации. Если, например, при трансформации 10 пг ДНК pBR322 на чашках, засеянных 1%-ной и 10%-ной реакционной смесью, появляются соответственно 10 и 100 колоний, ЭТ составляет $1 \cdot 10^8$ колониеобразующих единиц (к.о.е.) на 1 мкг pBR322. Для менее эффективных методик берут 1 нг pBR322 и рассеивают 1%-ное и 10%-ное разведение. В этом случае 10 колоний на 1%-ной чашке и 100 колоний на 10%-ной соответствуют эффективности трансформации $1 \cdot 10^6$ к.о.е./мкг.

6.3. Доля компетентных клеток

Важнейший параметр при оценке результатов трансформации — доля клеток, оказавшихся компетентными. Обычно она составляет 0,01—10% от общего числа жизнеспособных клеток

в культуре. Доля компетентных клеток определяет полный колониеобразующий потенциал данного препарата и измеряется с использованием насыщающих концентраций плазмидной ДНК (обычное соотношение числа плазмид и числа клеток — 200 : 1). Так, для трансформации 10^8 клеток следует взять $>2 \cdot 10^{10}$ молекул плазмиды (100 нг pBR322). Для проверки на 1 трансформацию берут 200 нг pBR322, 10 мкл вносят в 1 мл среды (разведение в 10^2 раз), 10 мкл этого разведения снова разводят в 100 раз и высевают 1 и 10% этого разведения на чашки с богатой селективной и неселективной средой. Долю компетентных клеток определяют, сравнивая число колоний, выросших в селективных и неселективных условиях. Для стандартной высокоэффективной методики доля компетентных клеток должна составлять не менее 5%.

6.4. Влияние компонентов и добавок

Методики, в которых используются различные добавки, можно проверить, сравнивая эффективность трансформации (и долю компетентных клеток), получающуюся в присутствии и в отсутствие добавок. ДМСО должен повышать эффективность в 10—20 раз, а ДТТ — в 2—4 раза. Если титр клеток значительно отличается от оптимального, эти величины становятся заметно ниже. Поэтому при постановке контролей следует определять титр клеток.

Компоненты буфера для трансформации лучше всего проверять, заменяя их аналогичными, но полученными из другого источника. Стоит попробовать обычную водопроводную воду (аэрированную для удаления хлора) вместо бидистиллированной или очищенной обратным осмосом. Воду из любого источника можно очистить активированным углем (табл. 6.13). Компоненты буфера можно удалять поодиночке, сравнивая получающиеся результаты с данными рис. 1 из работы [15].

Контроли можно разделить на два типа: используемые постоянно и ставящиеся при возникновении неполадок. Определять титр жизнеспособных клеток и эффективность трансформации следует в каждом опыте. Это помогает установить причину низкой эффективности трансформации. Если титр клеток, например, составил $5 \cdot 10^8$, а ЭТ — $2 \cdot 10^7$ (по высокоэффективной методике), то причина малой эффективности — слишком высокий титр клеток. Остальные контроли ставят, если трансформация недостаточно эффективна постоянно. По опыту автора последовательная замена компонентов позволяет достаточно надежно идентифицировать и устранить источник затруднений.

7. Практические замечания

Ниже кратко описано несколько используемых при трансформации практических приемов.

7.1. Рассев клеток

Клетки, обработанные согласно методике трансформации, несколько ослаблены, поэтому сразу после трансформации с ними следует обращаться осторожно. Для того чтобы рассеять клетки, нанесите на чашку 150 мкл среды в виде капли, затем в эту каплю внесите нужное количество клеток. (Этого не требуется, если клетки рассевают в объеме >200 мкл). Осторожно, но быстро распределите суспензию по чашке изогнутой пастеровской пипеткой. Автор использует для этого вращающийся круг. Чашка медленно поворачивается, а слегка опирающаяся на нее L-образная пастеровская пипетка равномерно втирает суспензию клеток в агар.

Если на чашку необходимо посеять весь объем реакции трансформации или же трансформационную смесь из нескольких пробирок, клетки лучше всего осадить центрифугированием при 600—800 g в течение 5 мин, удалить надосады и суспендировать их в 200—300 мкл среды, осторожно набирая и выпуская жидкость из пипетки.

7.2. Рассев в верхнем слое агара

Трансформационную смесь из одной или нескольких пробирок можно легко посеять на одну чашку, используя верхний слой агара. Для этого среду SOB (табл. 12), содержащую 1% агара, расплавляют и поддерживают в жидком виде при 42—45°C. Два миллилитра этого агара добавляют к суспензии клеток, перемешивают и выливают на чашку. После застывания верхнего слоя чашку переносят на 37°C и инкубируют до появления колоний. Чтобы верхний слой агара не застыл, не успев равномерно распределиться по чашке, чашку и трансформационную смесь необходимо перед рассевом подогреть до 37°C.

7.3. Тепловой шок

Стадия теплового шока входит во все методики трансформации *E. coli*. Оптимальное время шока зависит кроме других параметров от соотношения поверхности к объему суспензии клеток и от теплопроводности пробирки. Если трансформацию проводят препаративно или если вместо полипропиленовых

пробирок используют пробирки из другого материала, оптимальное время инкубации при 42°C следует подобрать экспериментально.

7.4. Хранение трансформированных клеток

После инкубации при 37°C в течение 1 ч трансформированные клетки можно хранить в течение ночи при 4°C. При использовании для инкубации клеток среды SOC (табл. 12) титр трансформированных клеток через 12 ч падает примерно на 10%. Жизнеспособность трансформированных клеток повышается в присутствии 20 мМ глюкозы. Если клетки необходимо сохранить дольше, их следует отмыть от трансформационного буфера. Добавьте к клеткам 2 мл среды SOC и осадите их при 800 g. Удалите надосады и мягко суспендируйте клетки в среде SOC. Даже после нескольких дней хранения при 4°C титр клеток падает менее чем на 10%.

Для сохранения трансформированных клеток в течение долгого времени разбавьте трансформационную смесь вдвое смесью среды SOB с глицерином (3:2) так, чтобы конечная концентрация глицерина составила 20%, перенесите в пробирки с завинчивающимися крышками, охладите во льду, быстро заморозьте в жидком азоте и храните замороженную культуру при -70°C. После оттаивания титр клеток составит >90% исходного.

8. Специальные случаи

8.1. Клонирование кДНК

Получение на основе мРНК двухцепочечной кДНК и введение ее в нужный плазмидный вектор — в целом сложный и малоэффективный процесс, поэтому для конструирования представительной библиотеки обычно имеется лишь небольшое количество исходной кДНК. В связи с этим колониеобразующий потенциал кДНК необходимо использовать с максимальной эффективностью. Для этого требуются высокоэффективные методы трансформации, высокая доля компетентных клеток в трансформационной смеси и условия, позволяющие достигнуть как максимального общего числа колоний, так и наибольшей возможной плотности колоний на каждой чашке. Сочетать два последних требования не всегда просто, так как максимальное общее число колоний достигается при трансформации очень малыми количествами ДНК, что увеличивает необходимое число отдельных реакций трансформации. В то же время на чашку диаметром 100 мм можно посеять лишь объем, соответствующий двум реакциям трансформации.

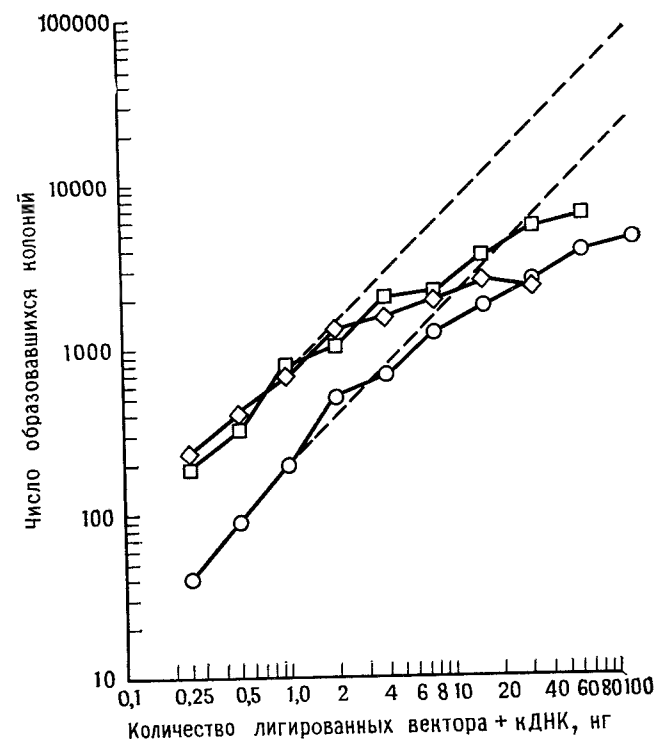


Рис. 1. Характеристические кривые трансформации клеток лигированными препаратами кДНК. Три различных препарата кДНК использовали для серии трансформаций, в которых различные количества кДНК смешивали с постоянным объемом компетентных клеток. Два препарата кДНК (светлые квадраты и кружочки) были получены на основе мРНК плаценты человека и лигированы с расщепленным *EcoRI* и *SalI* вектором pBR322 в соотношении вектор/кДНК 25:1 (приблизительно 5-кратный молярный избыток вектора). Третий препарат (ромбы) получен на основе мРНК гладких мышц эмбрионов кур и лигирован с pUC9 в весовом отношении 20:1. Во всех случаях указанное количество лигированной ДНК использовалось для стандартной трансформации, эффективность которой составляла $5 \cdot 10^8$ колоний на 1 мкг сверхспиральной pBR322. Пунктирные линии представляют экстраполяцию, сделанную в предположении, что удвоение количества ДНК приводит к удвоению числа колоний. Масштаб обеих осей — логарифмический.

Оптимизировать колониеобразующий потенциал и плотность колоний удобно, определяя уровень насыщения для данного препарата, состоящего из вектора и кДНК. Различные препараты обладают разными уровнями насыщения даже в тех случаях, когда они содержат равные количества ДНК. Для примера на рис. 6.1 сравнивается несколько сходных препаратов кДНК. Трансформацию проводили различными количествами каждого из препаратов (от 0,25 до 100 нг суммарной

ДНК). Для каждого препарата можно подобрать такое количество ДНК, трансформация которым приводит к удовлетворительному компромиссу между суммарным колониеобразующим потенциалом (размером библиотеки) и плотностью колоний в каждой из реакций трансформации. Особо отметим, что для всех препаратов насыщение наступает при 30 нг суммарной ДНК. Обычно считают, что 50—100 нг суммарной ДНК — достаточно малое ее количество, и используют его для трансформации. Однако, как видно из рисунка, проводя 10 трансформаций 5 нг ДНК, можно получить вдесятеро больше колоний. В связи с этим для каждого препарата к ДНК перед трансформацией *E. coli* следует построить кривую насыщения.

8.2. «Спасение» интегрированных плазмид

«Спасение» плазмиды, интегрированной в высокомолекулярную клеточную ДНК (т.е. восстановление ее в форме автономного репликона), осуществляют в три этапа: 1) расщепление ДНК рестриктазой, не имеющей участков узнавания внутри гена (генов) устойчивости к антибиотикам и области начала репликации плазмиды; 2) лигирование при низкой концентрации ДНК для циклизации продуктов расщепления; 3) трансформация *E. coli*. При этом происходит отбор небольшого числа фрагментов клеточной ДНК, несущих интегрированную плазмиду, по их способности трансформировать *E. coli*.

Этот метод применялся для выделения интегрированных плазмид и прилежащей к ним ДНК из дрожжей [20], культивируемых животных клеток [21, 22] и — недавно — из трансгенных мышей. Спасение плазмид из клеток млекопитающих происходит с очень низкой эффективностью [22] в связи с тем, что в этом случае частота трансформации плохо коррелирует с количеством присутствующей плазмидной ДНК. Поэтому для того, чтобы уравновесить малую эффективность восстановления плазмиды, необходима высокая эффективность трансформации.

При восстановлении плазмид основная масса ДНК не способна к трансформации и конкурирует с плазмидной ДНК. Конкуренция со стороны неплазмидной ДНК становится ощутимой, когда ее количество достигает 100 нг. Хотя в принципе можно использовать такие суммарные концентрации ДНК, при которых конкуренция еще незаметна, оптимальным будет тот уровень ДНК, при котором необходимое для восстановления число отдельных трансформаций минимально. Этот уровень составляет 200—500 нг суммарной ДНК на одну реакцию трансформации.

Готовя клеточную ДНК к процедуре восстановления плазмиды, следует проконтролировать лигирование. Для этого

аликвоты расщепленной рестриктазой и расщепленной и лигированной ДНК наносят на соседние дорожки 0,75%-ного агарозного геля, не содержащего бромида этидия. Гель окрашивают бромидом этидия после электрофореза. После лигирования должны появиться заметный сдвиг ДНК в сторону увеличения молекулярного веса и фракция ДНК, мигрирующая значительно медленнее всей массы линейной ДНК. Эта ДНК состоит из релаксированных ковалентно замкнутых кольцевых молекул и особенно полезна для оценки степени циклизации лигированной ДНК. Как правило, лигирование при восстановлении плазмиды проводят при концентрации ДНК 10—20 мкг/мл. Затем ДНК осаждают и растворяют в концентрации 25—100 мкг/мл. Если приведенным выше методом кольцевую ДНК обнаружить не удастся, то, по всей видимости, содержание ее недостаточно и препарат непригоден для эффективного восстановления плазмиды. В этом случае следует испытать другие препараты рестриктаз и ДНК-лигазы.

8.3. Хранение и амплификация плазмидных библиотек

Популяцию рекомбинантных плазмид можно ввести в *E. coli* одним из описанных в этой главе методов, а затем поддерживать в виде набора колоний на пористой нитроцеллюлозной подложке. Такой набор можно реплицировать, а полученные копии использовать для гибридизации с нуклеиновыми кислотами или скрининга с помощью антител, а также сохранять длительное время [23, 24].

Поддержание колоний на нитроцеллюлозных фильтрах и приготовление реплик обладают тем преимуществом, что каждый клон сохраняет свое положение. При этом нет опасности, что какие-либо клоны окажутся неадекватно представленными в библиотеке в результате дифференциального роста. Напротив, при выращивании популяции рекомбинантов в жидкой культуре некоторые из них могут стать сверх- или недопредставленными в библиотеке. При выращивании на фильтрах рост клеток, обладающих повышенной жизнеспособностью, видимо, тормозится из-за физических условий, менее благоприятных для быстрого и длительного роста, чем условия, в которых находится изолированная клетка в жидкой культуре. Главный недостаток поддержания колоний на фильтрах — трудоемкость их репликации. Это затрудняет получение большого числа копий плазмидной библиотеки и не дает возможности передавать ценные библиотеки другим исследователям.

Чтобы сочетать удобства амплификации на фильтрах и простоту обращения с жидкой культурой, можно пользоваться обоими способами одновременно. Клоны амплифицируют в виде колоний на фильтрах, что не допускает преобладания хоро-

А. Приготовление аликвот амплифицированной библиотеки

1. С плазмидной библиотеки, хранящейся в виде колоний на нитроцеллюлозных фильтрах, снимите свежий комплект реплик, как описано в работах [23, 24]. Прониккубируйте реплики при 37°C до тех пор, пока размер колоний не достигнет 0,5—1 мм (считая, что плотность колоний составляет 5000—20 000 колоний на фильтр). Во избежание загрязнения посторонними микроорганизмами рассев, репликацию и последующие стадии рекомендуется проводить в ламинарном шкафу.

2. Поместите фильтры вверх колониями в пустые чашки Петри. Добавьте по 10 мл среды SOB, содержащей 20% глицерина. Диспергируйте колонии, растирая их на фильтре резиновым шпателем.

3. Несколько раз наберите и выпустите суспензию из пипетки, затем перенесите ее в стерильную пробирку и поместите на лед. Окончательно диспергируйте клетки на встряхивателе. Титр клеток должен составить около 10^9 /мл. На этой стадии колонии с каждого фильтра можно объединить в смесь, соответствующую полной библиотеке, либо обрабатывать по отдельности в виде N наборов колоний с N исходных фильтров, представляющих полную библиотеку.

4. Разлейте суспензию клеток по 100—500 мкл в полипропиленовые пробирки. Быстро заморозьте в смеси сухого льда с этанолом или жидком азоте и храните в жидком азоте или при -70°C .

Б. Восстановление амплифицированной библиотеки из замороженных аликвот

1. Выньте аликвоту (или набор аликвот) из холодильника и выдержите при комнатной температуре. Как только суспензия растает, перенесите в лед.

2. Чтобы получить набор первичных аликвот, разбавьте аликвоту (аликвоты) в 10 раз средой SOC.

3. Приготовьте набор серийных разведений первичной аликвоты (аликвот) для определения колониеобразующего потенциала. Так как исходный титр клеток составлял около 10^9 /мл, титр первичных аликвот (без учета гибели клеток) составит около 10^8 /мл. Титр жизнеспособных клеток, однако, медленно понижается при хранении, поэтому реальный титр окажется несколько ниже, чем при отборе аликвот.

4. Рассейте по 10 мкл 10^2 , 10^3 , 10^4 и 10^5 -кратных разведений первичной аликвоты на чашках с подходящими антибиотиками. Инкубируйте ночь для образования колоний. Первичную аликвоту (аликвоты) храните на льду, а разведения выбросьте.

5. После посева серийных разведений определите титр первичных аликвот. В течение 24 ч хранения на льду титр понижается не более чем на 10% от исходного значения. Приготовьте свежее разведение первичной аликвоты с концентрацией около 10^5 колониеобразующих единиц/мл. При посеве 50—250 мкл разведения на чашку плотность колоний составит 5000—25 000. Рассейте на нитроцеллюлозных фильтрах, прониккубируйте до образования колоний и приготовьте реплики так, как описано в работах [24, 25]. Так как исходное расположение колоний было нарушено, для полного представления всех клонов следует засеять большее число фильтров, чем было в исходной библиотеке. Аликвота объемом 100 мкл, полученная с фильтра, содержащего 10^4 колоний, содержит около 10^7 клеток или около 1000 копий исходного набора клонов. Таким образом, даже после длительного хранения из этой аликвоты можно получить все клоны, содержащиеся в исходном наборе.

шо растущих (часто нерекомбинантных) клонов. Затем колонии с фильтров переносят в жидкую среду, бактериальную суспензию делят на аликвоты и хранят при -70°C или в жидком азоте. Один фильтр, несущий 20 000 колоний диаметром 1 мм, содержит около 10^{10} клеток. Если их суспендировать в 10 мл и заморозить в 100 аликвотах, то каждая из аликвот будет исходно содержать 10^8 клеток (или около 5000 копий каждого клона). Поэтому, хотя титр жизнеспособных клеток и понизится при хранении или транспортировке, оставшийся колониеобразующий потенциал будет достаточен для получения многих копий исходной библиотеки. Этот метод аналогичен методу амплификации фаговых библиотек с помощью получаемых на чашках лизатов [25].

При таком подходе, естественно, не сохраняется исходное взаимное расположение колоний. Кроме того, не каждый из клонов при расसेве после амплификации будет представлен тем же числом колоний, что и в исходной библиотеке. Статистику этого процесса можно описать при помощи распределения Пуассона, считая, что все клоны растут с одинаковой скоростью (часто неточное, но единственно возможное приближение). Так, если библиотека, поддерживавшаяся на N фильтрах, была смешана и затем заново рассеяна, то для того, чтобы все оригинальные клоны были представлены в этом рассеве, необходимо получить 1,5—2 N фильтров. Этот вопрос обсуждается в работе Кларка и Карбона [26]. Мы считаем, что скрининг дополнительных фильтров безусловно оправдан при поддержании и рассеве редких и ценных библиотек кДНК. Методика, иллюстрирующая один из способов приготовления и амплификации библиотек кДНК, приведена в табл. 14.

Литература

1. Cohen S. N., Chang A. C. Y., Hsu L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972).
2. Mandel M., Higa A. J. Mol. Biol., 53, 159 (1970).
3. Lederberg E. M., Cohen S. N. J. Bacteriol., 119, 1072 (1974).
4. Taketo A. J. Biochem., 72, 973 (1972).
5. Taketo A. J. Biochem., 75, 59 (1974).
6. Taketo A., Kuno S. J. Biochem., 75, 895 (1974).
7. Kreischmer P. J., Chang A. C. Y., Cohen S. N. J. Bacteriol., 124, 225 (1975).
8. Enea V., Vovis G. F., Zinder N. D. J. Mol. Biol., 96, 495 (1975).
9. Kushner S. R. In: Genetic Engineering, Boyer H. B. and Nicosia S. (eds.), Elsevier, Amsterdam, p. 17, 1978.
10. Norgard M. V., Keem K., Monahan J. J. Gene, 3, 279 (1978).
11. Dagert M., Ehrlich S. D. Gene, 6, 23 (1979).
12. Morrison D. A. In: Methods in Enzymology, Wu R. (ed.), Academic Press, Inc., NY, Vol. 68, p. 326 (1979).
13. Jones J. M., Primrose S. B., Robinson A., Ellwood D. C. J. Bacteriol., 146, 841 (1981).

14. Bergmans H. E. N., van Die I. M., Hoekstra W. P. M. J. Bacteriol., 146, 564 (1981).
15. Hanahan D. J. Mol. Biol., 166 (1983).
16. Appleyard R. K. Genetics, 39, 440 (1954).
17. Casadaban M., Cohen S. J. Mol. Biol., 138, 179 (1980).
18. Meselson M., Yuan R. Nature, 217, 1110 (1968).
19. Curtiss R., III, Inoue M., Pereira D., Hsu J. C., Alexander L., Rock L. In: Molecular Cloning of Recombinant DNA, Scott W. A. and Werna R. (eds.), Academic Press, NY, p. 99 (1977).
20. Hicks J. B., Hinnen A., Fink G. R. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 43, 1305 (1979).
21. Peucho M., Hanahan D., Lipsich L., Wigler M. Nature, 285, 207 (1980).
22. Hanahan D., Lane D., Lipsich L., Wigler M., Botchan M. Cell, 21, 127 (1980).
23. Hanahan D., Meselson M. Gene, 10, 63 (1980).
24. Hanahan D., Meselson M. In: Methods in Enzymology, Wu R. et al. (eds.), Academic Press, NY, Vol. 100, p. 333 (1983).
25. Maniatis T., Hardison R., Lacy E., Lauer J., O'Connel C., Quon D., Sim G. K., Efstradiadis A. Cell, 15, 687 (1978).
26. Clarke L., Carbon J. Cell, 9, 91 (1976).

ПРИМЕНЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ ИНДУЦИРОВАННЫХ IN VITRO МУТАЦИЙ, НЕ ИМЕЮЩИХ ФЕНОТИПИЧЕСКОГО ПРОЯВЛЕНИЯ У E. COLI

*Джанни Чезарени, Чинца Трабони, Дженнаро Чилиберто,
Лючиана Денте и Рикардо Кортесе*

В этой главе мы опишем методики, упрощающие идентификацию и отбор мутаций в заранее выбранных фрагментах ДНК и введение их в нужный генетический контекст. Эти методики можно использовать для отбора мутаций, не имеющих фенотипического проявления у *E. coli*. Для выявления таких мутаций создают генетические конструкции, в которых они оказываются сцепленными с маркерами, легко идентифицируемыми у *E. coli*.

1. Общий метод индукции и выявления замен оснований

При идентификации последовательностей ДНК, важных для какой-либо функции, часто бывает полезно или даже необходимо очертить границы искомой области. Для этого нужен быстрый и точный метод «зондирующего» мутагенеза. Основываясь на полученных этим методом результатах, исследователь может применять уже более специфичные методы мутагенеза in vitro, например с использованием синтетических олигонуклеотидов [1].

Недавно мы разработали простую методику, позволяющую быстро выделить и идентифицировать большое число мутантов, имеющих замены пар оснований в любом заранее выбранном участке ДНК. Метод основан на способности обратной транскриптазы включать некомплементарные основания в ходе синтеза ДНК in vitro и построен так, что бактериальные клоны, несущие нужные мутации, имеют легко различимый фенотип [2, 3]. Лучше всего, если последовательность-мишень клонирована в одноцепочечном векторе. Как показано в гл. 5 этой книги, любую плазмиду после несложных манипуляций легко получить в одноцепочечной форме. Таким образом, описываемая нами методика может найти весьма широкое применение [4].

1.1. Мутагенез

Для затравки синтеза ДНК in vitro небольшой фрагмент отжигают с соответствующей одноцепочечной ДНК-матрицей. При элонгации в присутствии неполного набора дезоксирибонук-

леозидтрифосфатов происходит включение некомплементарного нуклеотида в тех случаях, когда нет комплементарного [5]. Эта ошибка не может быть исправлена полимеразой, которые не обладают 3'-экзонуклеазной активностью, например обратной транскриптазой. После того как неправильное включение произошло, затравку, несущую на 3'-конце некомплементарный нуклеотид, можно достроить в присутствии всех четырех нуклеотидов [3, 5]. Этим способом легко произвести замену любой пары оснований вблизи 3'-конца затравки. Обычно эта замена оказывается единственной. Если, однако, комплекс затравки с матрицей инкубировать с обратной транскриптазой в отсутствие более чем одного дезоксинуклеотида, можно получить множественные замены пар оснований в положениях, комплементарных недостающим нуклеотидам.

1.2. Методика селекции мутантов

Как показали Борриас с соавт. [6], селекцию фаговых частиц ϕ X174 дикого типа можно проводить, трансформируя клетку *E. coli* одноцепочечной ДНК ϕ X174, которая несет *amber*-мутацию и отожджена с коротким фрагментом ДНК ϕ X174, включающим соответствующую последовательность дикого типа. В клетке затравка дикого типа достраивается до полной комплементарной цепи. Полученная двухцепочечная ДНК реплицируется с образованием как вирусов дикого типа, так и мутантных. Основываясь на этих данных, мы объединили удобный для селекции маркер с затравкой, использующейся для реакции мутагенеза *in vitro*. Таким образом, генетический маркер оказывается ассоциированным с цепью ДНК, синтезированной *in vitro*, и, следовательно, «сцепленным» с любой ошибкой, допущенной в ходе элонгации цепи ДНК [3, 4].

Можно использовать различные селективные маркеры. Ниже будет представлена подробная методика, которую мы применили для введения *in vitro* множественных мутаций в эукариотический ген тРНК. Подход, использованный нами в этих экспериментах для того, чтобы отличить фаговые частицы M13, являющиеся потомками матрицы, от фаговых частиц — потомков затравки, основан на способности α -пептида β -галактозидазы к комплементации α -фрагмента и расщеплению 5-бромо-4-хлоро-3-индолил- β -D-галактозида (X-Gal) с образованием синей окраски. Важное свойство α -пептида состоит в том, что его N-концевая последовательность не важна для функционирования и может быть заменена любой последовательностью аминокислот. На этом свойстве основана разработанная нами методика индукции замен пар оснований в лю-

бом коротком фрагменте ДНК и селекции клонов, содержащих эти мутации. Процедура состоит в следующем.

1. Фрагмент ДНК дикого типа, предназначенный для мутагенеза, клонируют в фаговом векторе M13mp внутри последовательности α -пептида β -галактозидазы таким образом, чтобы нарушить трансляционную рамку считывания. Содержащий такую вставку фаг не способен к синтезу активной β -галактозидазы и будет формировать бесцветные бляшки на чашках, содержащих X-Gal [7].

2. Одноцепочечную ДНК дикого типа отжигают с коротким фрагментом ДНК, несущим инсерцию или делецию одного или двух оснований, которые восстанавливают правильную рамку считывания. 3'-Конец этого фрагмента должен быть комплементарен последовательности ДНК вблизи области, в которой необходимо произвести замены оснований. Важно представлять себе, что инсерции или делеции, восстанавливающие рамку считывания, могут располагаться вне подвергнутого мутагенезу гена. Их удобно размещать в прилегающих последовательностях вектора.

3. Для введения в нужную позицию некомплементарного нуклеотида затравку элонгируют в присутствии неполного набора дезоксинуклеозидтрифосфатов. Затем добавляют недостающие нуклеотиды и элонгацию продолжают. Отожженный комплекс используют для трансформации *E. coli*. Фаги-потомки матрицы и мутировавшей цепи формируют соответственно бесцветные и синие бляшки. Синие бляшки будут содержать частицы фага с нужной мутацией. Так как затравку получают обычно путем расщепления ДНК рестриктазами, во многих случаях ее 3'-ОН конец расположен не совсем так, как требовалось бы для получения нужной мутации. В таких случаях необходимо модифицировать затравку, слегка удлив или укоротив ее. Для этого можно использовать полимеразную или экзонуклеазную активность фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*, подобрав соответствующий набор дезоксинуклеотидов.

Пример использования этой методики приведен на рис. 1. Матрицей (приготовленной так, как описано в табл. 1) служил фрагмент ДНК, кодирующий эукариотическую тРНК^{Phe} и клонированный по *EcoRI* и *BamHI* в M13mp701 [2]. Образовавшийся рекомбинант, обозначенный R78B, давал бесцветные бляшки, так как фрагмент, введенный в кодирующую область гена β -галактозидазы, вызывал сдвиг рамки на —1 нуклеотид. Затравку получали из другой плазмиды, обозначенной как R78Bo. Эта плазида была получена из R78B путем достройки липкого конца *BamHI*. Добавленные при этом четыре основания восстанавливали правильную рамку считывания гена β -gal, поэтому фаговые бляшки с R78Bo были окрашены в

Таблица 1. Выделение одноцепочечной ДНК фага М13 из инфицированных бактерий

Геном фага М13 представлен кольцевой молекулой одноцепочечной ДНК и упакован в палочковидный вирион. Фаг секретируется клеткой-хозяином в среду, где титр его может достигать 10^{12} вирионов/мл. После центрифугирования зараженной фагом культуры бактерий одноцепочечную ДНК нетрудно выделить из небольшого объема надосадка. Полученная таким путем ДНК пригодна для определения нуклеотидной последовательности и для экспериментов по направленному мутагенезу.

1. При помощи стерильной пастеровской пипетки засеьте свежей бляшкой фага 1,5 мл компетентной бактериальной культуры. Проинкубируйте с аэрацией 6 ч при 37°C.
2. Перенесите культуру в пробирку для микроцентрифуги и центрифугируйте 5 мин.
3. Перенесите надосадок в новую пробирку, не стараясь собрать его полностью. Если надосадок хранился более 1 дня, перед использованием отцентрифугируйте его заново.
4. Добавьте 200 мкл 2,5 М NaCl, 20% полиэтиленгликоля 6000. Проинкубируйте 15 мин при комнатной температуре.
5. Отцентрифугируйте 3 мин. Удалите надосадок пастеровской пипеткой. Отцентрифугируйте еще раз (недолго). Удалите следы надосадка пастеровской пипеткой с оттянутым концом.
6. Добавьте 100 мкл 10 мМ трис-HCl pH 8,0; 1 мМ ЭДТА и растворите осадок. Добавьте 100 мкл фенола, насыщенного 100 мМ трис-HCl pH 8,0, 10 мМ ЭДТА и экстрагируйте белки, осторожно перемешивая.
7. Отцентрифугируйте 1 мин. Отберите около 80 мкл водной фазы в новую микроцентрифужную пробирку.
8. Добавьте 20 мкл 5 М перхлората натрия и 50 мкл изопропанола.
9. Осадите 15 мин в микроцентрифуге. Осадок может быть невидимым.
10. Удалите надосадок пипеткой с оттянутым концом и растворите осадок в 100 мкл 0,3 М ацетата натрия.
11. Добавьте 300 мкл охлажденного во льду этанола. Проинкубируйте 5 мин в смеси сухого льда с этанолом.
12. Отцентрифугируйте 15 мин. Растворите осадок в 30 мкл 10 мМ трис-HCl pH 8,0, 0,1 мМ ЭДТА.

синий цвет [2]. Методика получения затравки приведена в табл. 2. Из R78Bo был выделен *Pst*I-*Hinf*I-фрагмент, который и отжигали с одноцепочечной R78B. Разница в последовательностях между матрицей и затравкой (обуславливающая сдвиг рамки) находится вне кодирующей области тРНК^{Pro}. Мы намеревались заменить остаток G в положении 31 остатком C. Присутствие остатков G в положениях 27 и 29, то есть между

Рис. 1. Селекция замен оснований, индуцированных in vitro с помощью обратной транскриптазы. Сплошной линией обозначена последовательность вектора М13. Заштрихованные прямоугольники — кодирующие последовательности β-галактозидазы. Косой штриховкой в R78B обозначена кодирующая последовательность с рамкой считывания, смещенной в результате введения последовательности-мишени для мутагенеза. Плазмида R78Bo — производная R78B, в которую путем достройки участка расщепления *Bam*HI добавлены четыре основания; вследствие этого восстанавливается правильная рамка считывания β-галактозидазы (прямая штриховка). Подробности приведены в тексте.

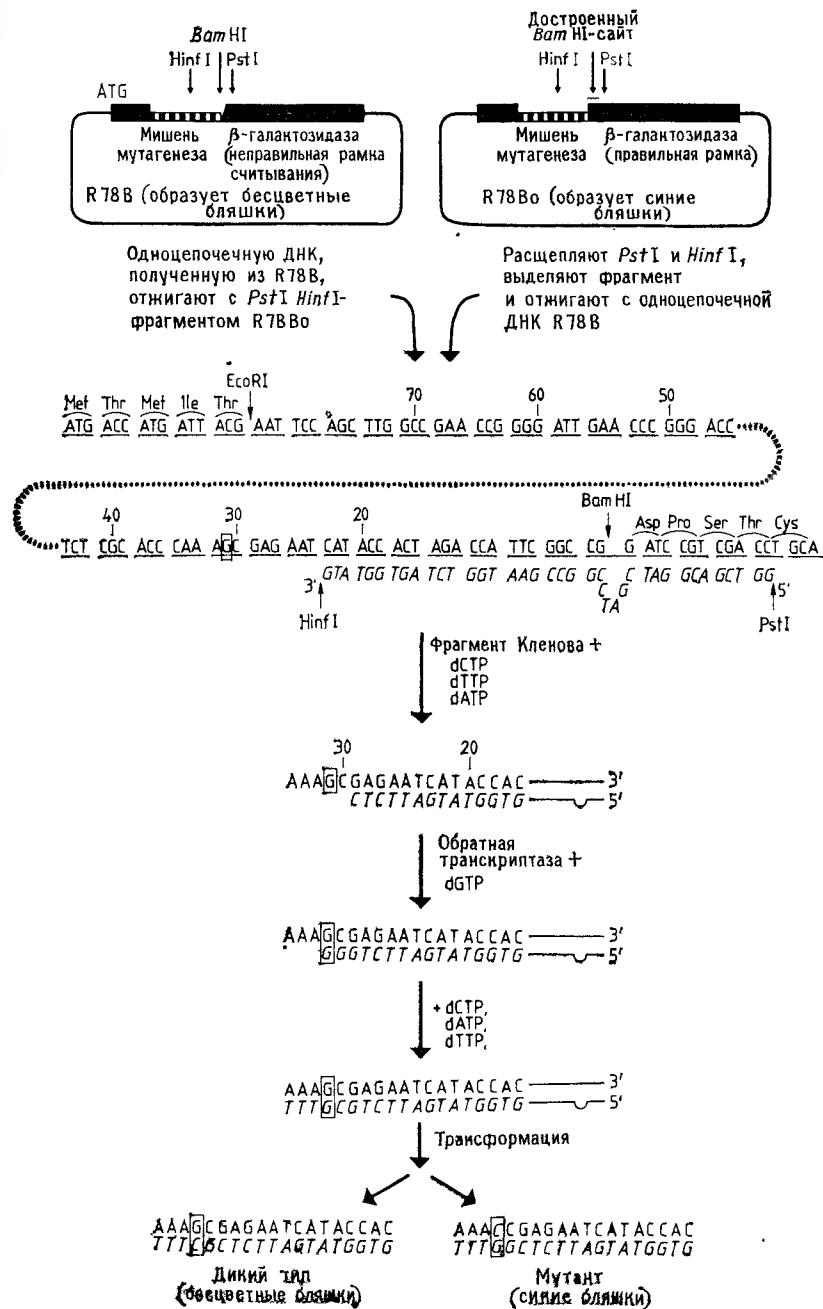


Таблица 2. Выделение двухцепочечной ДНК

В этой таблице приведена методика, использованная авторами для получения фрагмента длиной 39 п. н. из ДНК R78Bo.

1. Обработайте 10 мкг двухцепочечной ДНК R78Bo *Pst*I и *Hinf*I.
2. Нанесите продукты реакции на 15%-ный полиакриламидный гель (толщина 1 мм, ширина 20 см, длина 20 см).
3. Проведите электрофорез 3 ч при 150 В и 50 мА.
4. Окрасьте гель 15 мин в растворе этидиумбромид (5 мкг/мл).
5. Вырежьте зону, содержащую фрагмент ДНК длиной 39 п. н., и элюируйте ДНК 5 ч при 37 °С, добавив 5 мл буфера для экстракции¹⁾.
6. Разбавьте элюат в 4 раза водой и нанесите на колонку с ДЭАЭ-целлюлозой (DE52) объемом 0,2 мл.
7. Элюируйте ДНК 0,5 мл 1,5 М ацетата аммония (рН 10,0) в силиконированную полиалломерную пробирку для ротора SW60.
- Примечание: тРНК-носитель добавлять не следует.
8. Добавьте 1 мл охлажденного этанола.
9. Отцентрифугируйте в роторе SW60 15 мин при 40 000 об/мин.
10. Удалите надосажок и высушите осадок в вакуумной центрифуге-концентраторе. Растворите в 10 мкл воды.

¹⁾ Буфер для экстракции содержит 0,5 М ацетата аммония, 15 мМ ацетата магния; 0,5 мМ ЭДТА; 10% (вес/объем) SDS.

выбранной точкой и 3'-концом затравки (позиция 23), не позволяет прямо осуществить эту замену. В связи с этим мы инкубировали комплекс матрицы с затравкой с фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli* и смесью dATP, dTTP и dCTP для того, чтобы, подстроив шесть оснований к затравке, скопировать остатки G27 и G29. Затем фермент инaktivировали прогревом при 75 °С в течение 20 мин и невключенные нуклеотиды удаляли гель-фильтрацией. 3'-ОН конец полученного после этой обработки фрагмента-затравки был комплементарен нуклеотиду G29. Теперь для получения замены G31→C31 было достаточно добавить обратную транскриптазу и dGTP, при этом происходило правильное включение остатка G в положение 30 и неправильное — в положение 31. После 5 мин инкубации внесли недостающие дезоксинуклеотиды и синтез ДНК был продолжен еще в течение 30 мин. Подробная методика синтеза *in vitro* приведена в табл. 3. Продуктом этой реакции трансформировали *E. coli* по методике, приведенной в табл. 4.

Таблица 3. Мутагенез

А. Отжиг

1. Приготовьте смесь для отжига из:
 - 4 мкл затравки (подготовку фрагмента см. в табл. 2),
 - 4 мкл одноцепочечной кольцевой ДНК (150 мкг/мл; в данном случае — ДНК R78B),
 - 1 мкл буфера *Hip* (10×концентрат¹⁾),
 - 1 мкл воды.
2. Введите эту смесь в силиконированный капилляр и запаяйте.

Продолжение

3. Прокипятите 3 мин на водяной бане. Медленно охладите при комнатной температуре.

Б. Элонгация затравки

4. Проинкубируйте 5 мкл отожженной смеси 15 мин при комнатной температуре в буфере *Hip*, содержащем dCTP, dTTP и dATP в концентрации 50 мМ с 0,5 ед. ДНК-полимеразы (фрагмент Кленова) (конечный объем 20 мкл).
5. Прогрейте 20 мин при 75 °С.
6. Приготовьте из шприца (объем 1 мл) с иглой колонку и заполните ее 0,8 мл сефадекса G50. Присоедините колонку к микроцентрифужной пробирке, проткнув ее крышку иглой. Для удаления избытка воды отцентрифугируйте 5 мин при 1500 об/мин.
7. Нанесите на колонку 55 мкл реакционной смеси и присоедините к новой пробирке.
8. Отцентрифугируйте 5 мин при 1500 об/мин.

В. Введение некомплемментарного нуклеотида

9. Приготовьте следующую смесь:
 - 5 мкл отожженного комплекса матрица-затравка,
 - 5 мкл 5 мМ dGTP,
 - 5 мкл буфера для обратной транскриптазы (10×)²⁾,
 - 35 мкл воды,
 - 0,4 мкл обратной транскриптазы (12 ед/мкл).
10. Проинкубируйте 1 ч при 37 °С.
11. Добавьте 5 мкл 5 мМ смеси dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Проинкубируйте 1 ч при 37 °С.
12. Удалите невключенные нуклеотиды при помощи гель-фильтрации (см. стадии 6—8).

¹⁾ Буфер *Hip* (10×концентрат) содержит 0,5 М NaCl; 66 мМ MgCl₂; 66 мМ трис-HCl pH 8,0; 66 мМ β-меркаптоэтанол.

²⁾ Буфер для обратной транскриптазы (10×концентрат) содержит 0,4 М трис-HCl pH 8,0; 0,4 М MgCl₂; 10 мМ дитиотрейтол.

Таблица 4. Трансформация

1. К 200 мкл компетентных клеток¹⁾ штамма 71/18²⁾ или JM105³⁾ добавьте 20 мкл реакционной смеси после обратной транскрипции. Проинкубируйте во льду 1 ч.
2. Внесите 50 мкл свежей насыщенной культуры 71/18 или JM105; 25 мкл изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (IPTG) (20 мг/мл) и 25 мкл 5-бромо-4-хлоро-3-индолил-β-D-галактозида (BCIG) (20 мг/мл).
3. К трансформационной смеси добавьте 3 мл расплавленного и хранившегося при 42 °С верхнего агара, перемешайте и вылейте на чашку с BBL⁴⁾.
5. Инкубируйте в течение ночи при 37 °С.

¹⁾ Для получения компетентных клеток используют 40 мл экспоненциально растущей культуры, выращенной в L-бульоне. При ОП₆₀₀=0,2—0,4 клетки собирают центрифугированием в настольной центрифуге при 3000 об/мин. Осадок осторожно суспендируют в 20 мл охлажденного во льду 0,1 М CaCl₂ и инкубируют 20 мин при 0 °С. После повторного центрифугирования и суспендирования в 0,4 мл 0,1 М CaCl₂ компетентные клетки можно использовать для трансформации сразу или сохранять на льду в течение нескольких дней. Подробно приготовление компетентных клеток обсуждается в главе 6.

²⁾ Генотип *E. coli* 71/18 Δ[*lac-pro*]F'⁺[*lacI*^q*lacZ*ΔM15proAB]*supE*.

³⁾ Генотип *E. coli* JM105Δ[*lac-pro*]*thi strpA endA sbcB*15 F'⁺[*lacI*^q*lacZ*ΔM15proAB+].

⁴⁾ Среда BBL содержит: 10 г бакто-триптона; 5 г NaCl и 10 г бакто-агара на литр. Концентрация верхнего агара 0,7% вместо 1%.

Из препаратов двух фагов, образовавших синие бляшки, была выделена ДНК, анализ последовательности которой показал присутствие ожидавшейся мутации.

1.3. Эффективность мутагенеза

Общая эффективность приведенных выше реакций такова, что лишь несколько процентов полученных при трансформации клонов содержат мутацию. Для идентификации интересующих исследователя мутантов, таким образом, требуется дополнительная работа. Благодаря описанной в этой главе методике любая мутация оказывается сцепленной с легкообнаруживаемым маркером. В этом случае получаемые после трансформации мутантные клоны легко идентифицировать по фенотипу, обусловленному сцепленным маркером.

Частота появления мутаций зависит только от эффективности мутагенеза и системы, репарирующей неспаренные основания *E. coli*. Влияние этой активности мы постарались уменьшить используя недометилированную матрицу [2, 15]. По нашим данным, эффективность включения обратной транскриптазой некомплементарного нуклеотида при описанных выше условиях мало отличается от 100%, так как около 85% выявленных по сцепленному с затравкой генетическому маркеру бляшек содержат мутации.

1.4. Универсальный селективный маркер

Фенотип, определяемый рамкой считывания, оказался очень полезным для идентификации индуцированных мутаций в относительно коротких последовательностях ДНК. Для фрагментов ДНК большей длины этот метод непригоден из-за присутствия в последовательностях-мишенях *nonsense*-кодонов. Более общий подход основан на применении «подвижного» селективного маркера, например кодирующего $tRNA^{supF}$ фрагмента ДНК *E. coli* длиной 203 п.н. [8]. Происходит мутагенез следующим образом. Ген-мишень клонируют в одноцепочечном векторе. Затем двухцепочечную плазмидную ДНК расщепляют рестриктазой, так чтобы на одну молекулу приходился единственный разрыв. Эту линейаризованную случайным образом ДНК лигируют с очищенной ДНК $tRNA^{supF}$. После трансформации и отбора рекомбинантов, несущих ген-супрессор, получают семейство рекомбинантных плазмид, содержащих вставку $tRNA^{supF}$ в различных сайтах последовательности, в которую планируется ввести мутации [3]. Любую из этих плазмид можно использовать в качестве матрицы для реакции мутагенеза *in vitro*. Затравкой служит фрагмент ДНК, полученный из немодифицированного гена и выбранный так,

чтобы он в каждом случае при отжиге захватывал области, прилежащие к вставке $tRNA^{supF}$. Замены оснований вводят с помощью обратной транскриптазы, как описано выше. Мутанты можно отбирать по отсутствию *supF*-активности в бактериин-хозяине, несущей подходящие селективные маркеры с *amber*-мутациями. Отобранные рекомбинанты будут нести нужную мутацию, но не будут содержать ДНК $tRNA^{supF}$.

1.5. Другие методы направленного мутагенеза

Для индукции замен оснований разработаны и другие методы. Нередко используется специфичность мутагенного действия бисульфита натрия по отношению к одноцепочечной ДНК [9—12]. Этот метод, однако, характеризуется двумя крупными недостатками: во-первых, с его помощью можно индуцировать только транзиции, а, во-вторых, реакцию трудно проконтролировать так, чтобы получить единичные точковые мутации.

Известен также мутагенез, основанный на включении *in vitro* аналогов оснований, способных к неправильному спариванию [13]. В этом случае, как и при мутагенезе, индуцированном бисульфитом, можно получить замены оснований только типа транзиций.

Шортл с соавт. применили метод, основанный на включении неправильного нуклеотида в ходе синтеза ДНК *in vitro* полимеразой *E. coli* и использующий тот факт, что 3'-экзонуклеазная активность фермента Кленова не реализуется в отношении α -тионуклеотидов [14]. Этот метод в принципе сходен с методом направленного включения некомплементарных нуклеотидов с помощью обратной транскриптазы, описанным в этой главе и впервые использованным в работе [5]. Преимущество последнего метода, однако, состоит в использовании общедоступных реактивов.

2. Общий метод обмена аллельными последовательностями между двумя репликонами

Конечная цель экспериментов по мутагенезу — изучение фенотипа клеток, несущих в правильном генетическом контексте измененную последовательность ДНК. Большая часть методов мутагенеза, включая и описанные в разделе 1, однако, эффективна в отношении коротких фрагментов ДНК, клонированных в соответствующих векторах. Реконструкция геномных последовательностей, необходимая для изучения влияния мутации на функцию интересующего гена, несложна в том случае, когда имеются подходящие сайты рестрикции. Если такие сайты в интересующей нас последовательности встречаются не слишком часто и к тому же располагаются удобным обра-

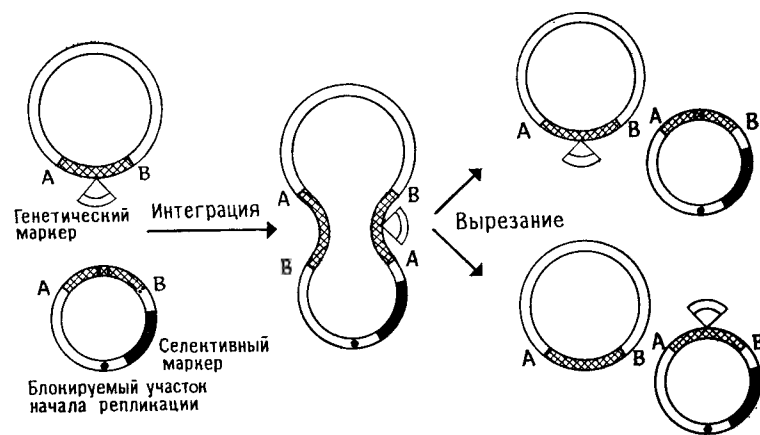


Рис. 2. Схема двуступенчатого рекомбинационного процесса, происходящего при обмене аллельных последовательностей между двумя репликонами. Одна из двух аллельных последовательностей сцеплена с генетическим маркером, фенотип которого можно легко обнаружить у *E. coli*. Отбор интеграторов проводят в таких условиях, в которых одна из двух точек начала репликации не функционирует. Остальные подробности приведены в тексте.

зом, реконструкция геномной области возможна. Более общий подход предполагает обмен аллельными последовательностями между двумя репликонами, происходящий *in vivo* в результате двойной рекомбинации. Двойные рекомбинации, однако, наблюдаются крайне редко, и такой подход применим только при наличии подходящего метода селекции. К счастью, известен ряд приемов, позволяющих преодолеть эту трудность за счет разделения двойного рекомбинационного события на стадии интеграции и вырезания (рис. 2). Если есть возможность проводить селекцию последовательно на обеих стадиях рекомбинации, то эффективность обмена аллельными последовательностями между двумя репликонами будет зависеть только от расположения мутации относительно точек соединения (A и B) вектора со вставкой. Большинство подобных методов требует, чтобы один из репликонов нес пригодный для селекции маркер и участок начала репликации, блокирующий при определенных условиях (рис. 2). Отбор интеграторов осуществляют путем селекции по этому маркеру в условиях, когда участок начала репликации блокирован. Селекцию на стадии вырезания проводят различными методами, зависящими от типа применяемых репликонов и маркеров, — эта техника подробно описана в приложении к работе [16].

В большинстве случаев аллельные последовательности, обмен которыми между двумя репликонами необходимо произвести, не имеют фенотипического проявления в *E. coli*. В та-

ких случаях рекомбинантные клоны, содержащие нужный аллель, можно идентифицировать, только проведя анализ нуклеотидной последовательности большого числа клонов. Вот почему удобно пометить предназначенный для обмена участок ДНК каким-либо генетическим маркером, легкообнаруживаемым у *E. coli*. Для этого можно использовать любой из описанных выше маркеров, а также маркеры устойчивости к антибиотикам.

Недавно нами разработана методика, позволяющая переносить мутации из клонированных в плазмиде небольших фрагментов ДНК в большие геномные фрагменты, клонированные в λ -векторах. Она основана на селекции двойных рекомбинационных событий и идентификации делеций по их способности вызывать сдвиг рамки в гене, который кодирует полипептид с легкообнаруживаемым фенотипом. Как уже упоминалось в разделе 1 этой главы, Трабони с соавт. [7] описали метод селекции мутантов со сдвигом рамки на примере коротких последовательностей, введенных во фрагмент ДНК, который кодирует α -пептид β -галактозидазы. Мы покажем, как эти мутации можно ввести в их исходное генетическое окружение при помощи двустадийного рекомбинационного процесса: интеграции и последующего вырезания несущей такую мутацию плазмиды в геном рекомбинантного фага, содержащего полную размерную копию клонированного гена. Применимость метода, однако, не ограничивается мутациями сдвига рамки. Если уже имеется тест-плазмида с небольшой делецией, сдвигающей рамку считывания β -галактозидазы, то любая замена основания в последовательности, затронутой делецией, может заменить эту делецию в исходном генетическом окружении. Фаги, несущие после интеграции—вырезания делецию или замену основания, можно идентифицировать соответственно по их способности или неспособности вызывать сдвиг рамки в тест-плазмиде. Все стадии этого метода (интеграция, вырезание, тест на присутствие мутации) позволяют проводить селекцию либо предполагают возможность скрининга.

Схема метода приведена на рис. 3. Хотя данный метод разработан для работы с фрагментами ДНК, не имеющими фенотипического проявления в *E. coli*, мы проиллюстрируем его на примере последовательности, придающей бактерии-хозяину устойчивость к тетрациклину. Рекомбинация осуществляется между плазмидой и фагом λ , несущим замену i21. Плазмида pUC8-91/3 (РuСb на рис. 3) представляет собой вектор pUC8, в который введен фрагмент длиной 91 п. н., полученный после расщепления *Sau3A* гена устойчивости к тетрациклину pBR322 [17]. Введение этих 3N+1 нуклеотидов в ген, кодирующий α -пептид β -галактозидазы, нарушает трансляционную рамку считывания и синтез активного α -пептида. Плазмида pUC8-91/3

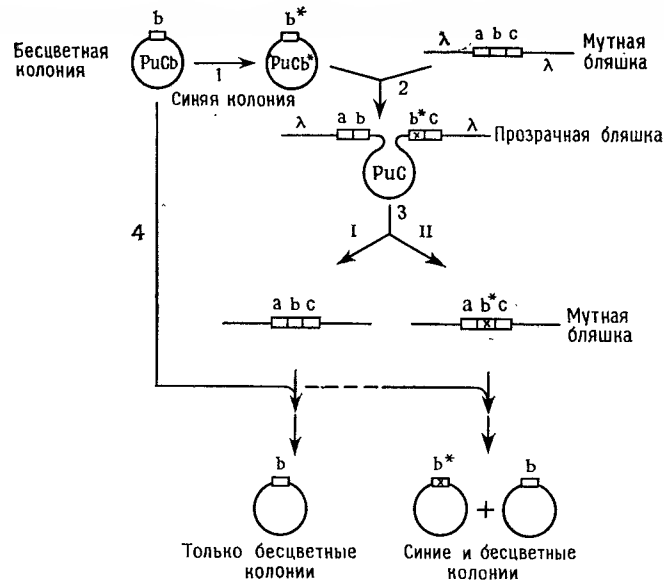


Рис. 3. Схема эксперимента по переносу мутации (b^*) из небольшой плазмиды в фаг λ . Кольцевые и линейные структуры представляют соответственно плазмиды и фаги; буквами a , b и c обозначены участки исследуемого гена. Цифры 1—4 обозначают стадии методики: 1. Отбор мутаций со сдвигом рамки (во вставке b), восстанавливающих правильное считывание гена, кодирующего α -пептид фермента β -галактозидазы. Селекция возможна благодаря тому, что эта мутация приводит к изменению фенотипа — появлению синих колоний. 2. Отбор прозрачных бляшек, образуемых фаговыми частицами, содержащими в своем геноме «мутантную» плазмиду. 3. Отбор мутных бляшек, образуемых фагом после выщепления плазмиды. 4. Идентификация фаговых частиц, несущих искомую мутацию, по их способности придавать синюю окраску колониям с плазмидами дикого типа.

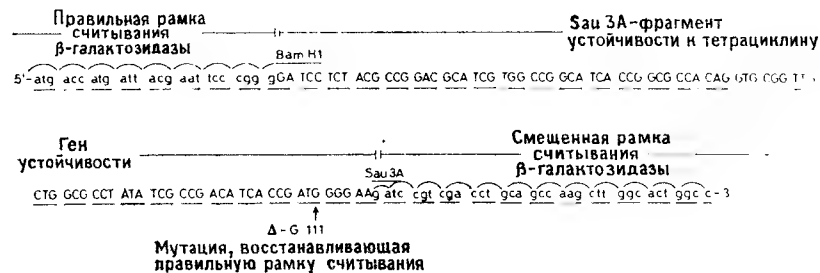


Рис. 4. Нуклеотидная последовательность фрагмента длиной 91 п.н., введенного в область полилинкера $pUC8$. Строчными буквами обозначены нуклеотиды последовательности $pUC8$, а прописными — фрагмента 91 п.н., вырезанного из гена устойчивости к тетрациклину (tet^R) $pBR322$. Изменение рамки считывания после вставки вызывает превращение правильных кодонов (обозначены дугами над исходными триплетами $pUC8$) в ошибочные, подчеркнутые прямыми линиями. Указана также делеция одной пары оснований ($\Delta G111$), восстанавливающая правильную рамку считывания.

$f15$ ($PuCb^*$ на рис. 3) получена из $pUC8-91/3$ путем делеции G-остатка в результате частичного гидролиза ДНКазой I [18]. Эта делеция (рис. 4, мутация $\Delta G111$) восстанавливает правильную рамку считывания, что приводит к появлению активной β -галактозидазы и образованию синих колоний на содержащем X-Gal агаре. В таком эксперименте в ходе переноса мутации из одного окружения в другое фенотип «синие колонии» используется как маркер делеции. Фаг G6 (λabc на рис. 3) — производный от NM616 [19], в котором $EcoRI$ -фрагмент, содержащий N-концевую последовательность гена β -галактозидазы, заменен $PvuII$ - $EcoRI$ -фрагментом $pBR322$, содержащим ген устойчивости к тетрациклину.

Целью эксперимента являлся обмен аллельными последовательностями посредством интеграции — вырезания. В приведенном примере для отбора на стадии интеграции в качестве маркера использовали фенотип нарушенной иммунности (*aber-*

Таблица 5. Интеграция плазмид, несущих мутации, в фаг, содержащий соответствующий ген дикого типа

Метод проиллюстрирован на примере гибридов, образующихся между фагом G6 (λabc на рис. 3) и плазмидой $pUC9-91/3 f15$ ($PuCb^*$ на рис. 3).

1. Засейте 5 мл L-бульона одной колонией *E. coli* (штамм 71/18), несущей плазмиду $pUC8-91/3f15$. Инкубируйте на качалке при 37°C до насыщения.

2. Приготовьте одну чашку с 1%-ным агаром на L-бульоне¹⁾. В 4 мл верхнего слоя (0,7%-ный агар на L-бульоне) внесите 0,2 мл клеток 71/18 ($pUC8-91/3f15$). Вылейте на чашку и оставьте для застывания на 10 мин при комнатной температуре.

3. Капните на чашку лизат фага G6 (10^5 — 10^7 бляшкообразующих единиц) и проинкубируйте ночь при 37°C.

4. Из области бактериального лизиса отберите пастеровской пипеткой немного верхнего агара и перенесите в 1 мл буфера для разведения фага²⁾. Добавьте каплю хлороформа.

5. В три пробирки внесите 100, 30 и 10 мкл суспензии фага.

6. В эти три пробирки добавьте по 100 мкл клеток 71/18 в 10 мМ $MgSO_4$ и проинкубируйте 10 мин при комнатной температуре.

7. В каждую пробирку внесите по 3 мл верхнего слоя и вылейте на чашки с агаром на L-бульоне. Проинкубируйте при 37°C. Среди множества мутных бляшек появятся прозрачные, образовавшиеся в результате интеграции плазмиды в хромосому фага.

8. Пастеровской пипеткой отберите прозрачную бляшку и перенесите в 1 мл фагового буфера.

9. Разбавьте эту суспензию в 100 раз фаговым буфером и внесите 100 и 20 мкл в пробирки, содержащие по 100 мкл клеток 71/18 в 10 мМ $MgSO_4$.

10. Добавьте в пробирки по 3 мл верхнего агара, вылейте смесь на чашку, проинкубируйте ночь при 37°C. На фоне бактериального газона должны быть хорошо заметны изолированные прозрачные бляшки, образованные гибридом плазмиды и фага.

¹⁾ Состав L-бульона: бакто-триптон — 10 г; дрожжевой экстракт — 5 г; NaCl — 5 г на литр.

²⁾ Состав фагового буфера: 10 мМ трис-HCl pH 7,4; 10 мМ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,01% желатина.

А. Селекция с помощью ЭДТА

1. Отберите десять хорошо отделенных друг от друга прозрачных бляшек, образованных гибридными фаговыми частицами, несущими плазмиду, и перенесите их в 10 пробирок, содержащих стерильный 0,1 М раствор ЭДТА pH 8,0. Проинкубируйте 60 мин при 50 °С.

2. 5 и 20 мкл этой суспензии смешайте с 0,2 мл клеток 71/18 (в 10 мМ MgSO₄) и 3 мл верхнего слоя и вылейте на чашки с L-агаром¹⁾. Проинкубируйте ночь при 37 °С. Проверьте, появились ли мутные бляшки²⁾.

Б. Обогащение атр^R-колониями с исключенной плазмидой

3. Приготовьте чашку с L-агаром. В 4 мл верхнего слоя (0,7%-ная агароза на L-бульоне) внесите 200 мкл насыщенной культуры клеток 71/18, несущих pUC8-91/3, и вылейте смесь на чашку.

4. С помощью стерильных зубочисток пересейте фаг из мутных бляшек, полученных в результате селекции с ЭДТА, параллельными штрихами на чашку, приготовленную на стадии 3. Проинкубируйте ночь при 37 °С.

5. Перепечатайте эту чашку на чашку с 4 мл верхнего слоя, содержащего 200 мкл культуры 71/18. Охладите чашки 1 ч при 4 °С, проинкубируйте ночь при 37 °С.

6. На фоне мутных штрихов должны появиться прозрачные точки. Пастеровской пипеткой отберите по одной прозрачной бляшке из каждого штриха и перенесите в 3 мл L-бульона, содержащего 500 мкг/мл ампициллина. Инкубируйте на качалке в течение ночи при 37 °С со встряхиванием.

В. Идентификация мутации со сдвигом рамки по синему цвету колоний

7. Осадите клетки из каждой культуры объемом 3 мл (стадия 6) центрифугированием. Ресуспендируйте каждый из осадков в 1 мл 10 мМ трис-HCl pH 8,5; 1 мМ ЭДТА и перенесите в микроцентрифужные пробирки. Осаждайте клетки 2 мин в микроцентрифуге.

8. Суспендируйте осадок в 100 мкл 15% сахарозы; 50 мМ трис-HCl pH 8,5; 50 мМ ЭДТА. Добавьте 50 мкл лизоцима (5 мг/мл).

9. Заморозьте в смеси сухого льда с этанолом и дайте оттаять при комнатной температуре.

10. Проинкубируйте 15 мин во льду. Добавьте 300 мкл холодной (0 °С) воды и проинкубируйте 5 мин во льду.

11. Проинкубируйте 15 мин при 70 °С, осадите хромосомную ДНК и обломки клеток 15 мин в микроцентрифуге.

12. Удалите осадок с помощью пастеровской пипетки с загнутым концом. К надосадку добавьте 70 мкл 5 М перхлората натрия, затем 200 мкл изопропанола.

13. Отцентрифугируйте 15 мин в микроцентрифуге.

14. Растворите осадок в 100 мкл 0,3 М ацетата натрия. Добавьте 300 мкл этанола и выдержите 15 мин при -70 °С.

15. Удалите надосадок и промойте осадок 70%-ным этанолом.

16. Высушите осадок в вакуумном эксикаторе и растворите в 100 мкл воды.

17. Добавьте 20 мкл этого раствора к 200 мкл компетентных клеток 71/18, приготовленных так, как описано в примечании к табл. 4.

18. Проинкубируйте 30 мин во льду и 2 мин при 42 °С.

19. Рассейте трансформированные клетки на чашках с L-агаром, содержащим 100 мкг/мл ампициллина, 40 мкл X-gal (20 мг/мл в диметилформамиде) и 20 мкл IPTG (20 мг/мл в воде). Проинкубируйте ночь при 37 °С. Появление синих колоний показывает, что исходные мутные бляшки были образованы фагом, содержащим мутацию сдвига рамки.

¹⁾ Состав L-агара приведен в табл. 5 (стадия 2).

²⁾ В приводимом примере можно провести проверку на устойчивость к тетрациклину. Отберите 3-5 отдельных мутных бляшек (для каждого из исходных прозрачных клонов) стерильными зубочистками и рассейте их на чашки с L-агаром и параллельно на такие же, но с добавлением 5 мкг/мл тетрациклина. Клоны, растущие на обычной чашке, но не растущие на чашке с тетрациклином, обнаруживаются с частотой около 5%.

rant immunity), приобретаемый фагом i21 при интеграции в него плазмиды [20]. Гибридный фаг можно легко идентифицировать, так как вследствие репликации плазмиды он образует вместо мутных бляшек прозрачные (рис. 3, стадия 2, подробнее см. табл. 5). Далее происходит случайное выщепление плазмиды из генома гибридных фагов; препарат можно обогатить фаговыми частицами, из которых плазида вырезана (рис. 3, стадия 3), путем инкубации в присутствии хелатирующих агентов [21]. Эта процедура описана в табл. 6. На данной стадии можно проверить, удалось ли перенести мутацию в содержащийся в фаге полный ген, так как эксперимент проводился с геном, обуславливающим характерный фенотип (устойчивость к тетрациклину). Если же интересующая нас мутация не имеет фенотипического проявления у *E. coli*, необходимо тестировать клоны другим способом. Это можно сделать, основываясь на фенотипическом проявлении в *E. coli* самой делеции, а именно на ее способности придавать колониям, несущим плазмиды pUC8-98/3, синюю окраску. Другими словами, содержащие делецию фаги можно идентифицировать при помощи «обратной» рекомбинации с плазмидой pUC8-91/3, так как только эти фаги после цикла интеграции — вырезания могут давать плазмиды, синтезирующие активный α -пептид. Эта методика приведена в табл. 6.

Благодарности

Мы благодарим Уэнди Мозес за перепечатку рукописи. Работа, сделанная в Италии, финансировалась Progetto Finalizzato Ingegneria Genetica e Basi Molecolari delle Malattie Ereditarie, CNR, Рим, Италия.

Литература

1. Fritz H.-J. In: DNA Cloning, Volume I — A Practical Approach, Glover D. M. (ed.), IRL Press, Ltd., Oxford, pp. 151—163 (1985).
2. Traboni C., Cortese R., Ciliberto G., Cesareni G. Nucleic Acids Res., 11, 4229 (1983).
3. Traboni C., Ciliberto G., Cortese R. Cell, 36, 179 (1984).
4. Dente L., Cesareni G., Cortese R. Nucleic Acids Res., 11, 1645 (1983).
5. Zakour R. A., Loeb L. A. Nature, 295, 708 (1982).
6. Borrias W. E., Wilshut J. T. C., Vereijken J. M., Weisbeck P. J., Van Arkel G. A. Virology, 70, 195 (1976).
7. Traboni C., Ciliberto G., Cortese R. EMBO J., 1, 415 (1982).
8. Ryan H. J., Belagaye R., Brown E. L., Fritz H. J., Khorana H. G. J. Biol. Chem., 254, 10803 (1979).
9. Shortle D., Nathans D. J. Mol. Biol., 131, 801 (1979).
10. Everett R. D., Chambon P. EMBO J., 1, 433 (1982).
11. Folk W. R., Hoffstatter H. Cell, 33, 585 (1983).
12. Ciampi M. S., Melton D. A., Cortese R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 1388 (1982).

13. Wieriga B., Meyer F., Reiser J., Weissmann C. *Nature*, **301**, 38 (1983).
14. Shortle D., Grisafi P., Benkovic S. J., Botstein D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 1588 (1982).
15. Kramer W., Schughart K., Fritz H. J. *Nucleic Acids Res.*, **10**, 6475 (1982).
16. Silhavy T. J., Berman M. L., Enquist L. W. *Experiments with Gene Fusions*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1984.
17. Vieira J., Messing J. *Gene*, **19**, 259—268 (1982).
18. Lorenzetti R., Cesareni G., Cortese R. *Mol. Gen. Genet.*, **192**, 515 (1983).
19. Mileham A. J., Revel H. R., Murray N. E. *Mol. Gen. Genet.*, **197**, 227 (1980).
20. Windass J. D., Brammar W. J. *Mol. Gen. Genet.*, **172**, 329 (1979).
21. Parkinson J. S., Davis R. W. J. *Mol. Biol.*, **56**, 425 (1971).
22. Messing J., Groneborn B., Muller-Hill B., Hofschneider P. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3642 (1977).

НАПРАВЛЯЕМЫЙ ОЛИГОНУКЛЕОТИДАМИ МУТАГЕНЕЗ В РЕКОМБИНАНТНЫХ НИТЕВИДНЫХ ФАГАХ

Ханс-Иоахим Фриц

1. Введение и теоретическое обоснование метода

1.1. Направленный мутагенез и конструирование мутаций

С недавних пор внимание исследователей привлекли методы направленного мутагенеза. С их помощью удается вызывать мутации с частотой до нескольких процентов, что позволяет проводить генетический анализ даже при отсутствии внешне заметных изменений фенотипа. Для идентификации мутаций можно использовать биохимические методы, а генетический анализ вести не так, как обычно, — от фенотипа к гену, а в обратном направлении. Важно, что мутации, полученные в результате направленного мутагенеза, часто не менее, а даже более интересны, чем возникающие при спонтанном мутагенезе или полученные традиционными методами.

Существуют две категории методов направленного мутагенеза.

Первые позволяют вводить в более или менее точно определенные последовательности-мишени необходимое число точковых (единичных) мутаций. С помощью методов, относящихся ко второй категории, в мишени создаются сложные, точно заданные изменения. Области применения этих методов не перекрываются, а выбор того или другого из них зависит от цели конкретного эксперимента.

Из второй группы наиболее часто применяется метод восстановления генетического маркера [1], введенного в синтетический олигонуклеотид [2]. Фрагмент-мишень мутагенеза клонируют в подходящем векторе — обычно производном нитевидного фага (например, серии M13mp). Мишенью для мутагенеза служит одноцепочечная ДНК, выделенная из рекомбинантного фага. Затем синтезируют короткий фрагмент комплементарной цепи (обычно длиной около 15 нуклеотидов), содержащий нужные изменения в структуре. Синтетический олигонуклеотид отжигают с комплементарным участком ДНК-мишени и используют в качестве затравки для ферментативного синтеза *in vitro* полной двухцепочечной ДНК. Полученная в результате молекула ДНК комплементарна по всей длине, за исключением участка, где одна из цепей несет структурные изменения. Этот гетеродуплекс используют для трансфекции клеток *E. coli*, а из полученного фагового потомства отбирают частицы, со-

державшие (—)-цепь ДНК, так как именно она содержит синтетический олигонуклеотид.

Этот метод исключительно гибок и позволяет производить различные изменения в структуре ДНК. С его помощью можно получать точковые мутации, делеции и вставки. Если используют чистую, однородную по структуре затравку, то в результате экспериментов такого типа образуются одиночные легко выявляемые мутации. При использовании методов категории 1 образуется несколько мутаций.

Главные преимущества метода состоят в следующем.

1. Рабочие гипотезы о структурно-функциональных взаимоотношениях в биологических макромолекулах можно проверить строгим и прямым экспериментом.

2. Если представления о структурно-функциональных взаимоотношениях в данной биологической макромолекуле развиты в достаточной степени, то этим же методом можно направленно изменить свойства данной молекулы. Первые результаты, полученные при использовании такого подхода, уже опубликованы [3].

1.2. Основы биологии фага M13

Для направляемого олигонуклеотидом мутагенеза требуется одноцепочечная ДНК-мишень, с которой гибридизуют мутагенную затравку. Удобнее всего клонировать ДНК-мишень в производных фага M13, поскольку в этом случае возможно «биологическое разделение цепей». Основные этапы жизненного цикла фага M13 охарактеризованы в одной из глав книги [18]. Векторы на основе фага M13 получены путем введения в его геном короткого фрагмента *lac*-ДНК *E. coli*. Этот фрагмент содержит также несколько участков расщепления рестриктазами [4]. Фаг M13 инфицирует клетки *E. coli*, присоединяясь к F-пилам. Таким образом, для работы с векторами на основе M13 пригодны лишь F⁺- и Hfr-штаммы.

1.3. Возможные механизмы закрепления мутаций

После введения гетеродуплексной ДНК в клетку-хозяина (если, как это иногда бывает, одна из цепей не будет утеряна) события могут развиваться в двух направлениях.

1. Может произойти пассивная сегрегация двух цепей в ходе полуконсервативной репликации. Образуются фаговые частицы двух типов, и в случае θ -репликации выход мутантной цепи составит до 50%. Для фагов M13 вследствие асимметричной репликации генома можно ожидать повышенный выход маркера.

2. Неспаренная область гетеродуплекса перед началом репликации может подвергнуться репарации. В этом случае образуется фаговое потомство только одного типа, а выход мутанта будет зависеть от того, какую из цепей матрицы выберет ферментативный аппарат репарации неспаренных оснований. Было показано, что этот аппарат действительно оказывает большое влияние на эффективность мутагенеза [5] (см. ниже).

1.4. Репарация неспаренных оснований в *Escherichia coli* и необходимость метилирования аденина в используемой для трансфекции гетеродуплексной ДНК

Имеющаяся у *E. coli* система репарации неспаренных оснований вносит свой вклад в точность репликации ДНК, заменяя на пострепликативной стадии неправильно включенные нуклеотиды, не исправленные действующей в ходе репликации системой коррекции [6]. Выбор цепи для репарации основан, вероятнее всего, на временном недометилировании последовательности GATC в новосинтезированной цепи [7–9]. Другими словами, система пострепликативной репарации считает правильной информацию, содержащуюся в полностью метилированной цепи ДНК, а подлежащей замене — в неметилированной цепи.

Последовательность GATC является мишенью для метилирования аденина в положении N⁶ метилазой *dam* *E. coli* [10]. Эти участки в геноме нитевидных фагов недопредставлены: у M13 их три [11] и по четыре — в геномах фагов f1 и fd [12]. Тем не менее было показано, что по крайней мере некоторые замены единичных нуклеотидов в сконструированных гетеродуплексных молекулах ДНК этих и родственных фагов подвержены зависящей от метилирования репарации как *in vivo* [5, 13], так и *in vitro* [14]. Это приводит к ряду последствий для направленного мутагенеза. Наиболее часто используемая сейчас методика [2] включает следующие стадии.

1. Выделение метилированной ДНК вирионов M13 из хозяина дикого типа (т. е. *dam*⁺).

2. Отжиг синтетического олигонуклеотида с геномом рекомбинантного фага.

3. Достройка цепи *in vitro* ДНК-полимеразой I и последующее замыкание второй цепи в кольцо ДНК-лигазой.

4. Биохимическое обогащение препарата ковалентно замкнутой ДНК.

5. Трансфекция.

Очевидно, что используемая для трансфекции гетеродуплексная ДНК в этом случае гемиметилирована; метилированные остатки аденина находятся только в (+)-цепи. Поэтому, если неспаренный участок ДНК подвергается репарации, ак-

тивность ее будет направлена против нужного синтетического маркера. Не приходится удивляться, что при использовании данной методики выход маркера не превышает 5%. Ниже мы опишем метод, позволяющий обойти эту трудность и, более того, обратить на пользу активность направляемой метилированием системы репарации, применяя для трансфекции гемиметилированную гетеродуплексную ДНК, несущую метилированные основания в (—)-цепи.

1.5. Применение частично дуплексной ДНК и использование гетеродуплексной ДНК с GATC-сайтами, гемиметилированными нужным образом

Гемиметилированную гетеродуплексную ДНК с метилированными остатками аденина в (—)-цепи получают следующим образом.

1. Фрагмент-мишень клонируют в векторе M13 и после наращивания рекомбинантного фага в *dam*⁻-хозяине выделяют неметилированную фаговую ДНК.

2. Вектор M13 (без вставки) размножают в *dam*⁺-хозяине и выделяют метилированную репликативную форму (РФ) ДНК M13.

3. РФ-ДНК расщепляют по сайту (сайтам) рестрикции, использовавшемуся для клонирования вставки.

4. Линеаризованную РФ-ДНК денатурируют нагреванием и ренатурируют в присутствии избытка рекомбинантной одноцепочечной ДНК. В результате получают гемиметилированную двухцепочечную ДНК с брешью (частично дуплексная ДНК, чдДНК), у которой метилирована неполная (—)-цепь. Экзогенная ДНК находится в одноцепочечной форме.

5. Мутантную затравку отжигают с одноцепочечным участком (брешью) и достраивают с помощью ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы (см. выше).

6. Полученные молекулы используют для трансфекции клеток *E. coli*. Мутантная цепь и цепь дикого типа разделяются в процессе репликации.

7. Фаговое потомство используют для новой инфекции при низкой множественности.

Преимущества метода

1. Не происходит отжига мутантной затравки с неспецифическими участками ДНК, так как для гибридизации доступно лишь небольшое «окошко» одноцепочечной ДНК.

2. Облегчается реакция достройки, так как в чдДНК вся векторная ДНК уже находится в двухцепочечной форме.

3. Репарация неспаренных оснований ДНК не затрагивает синтетического маркера.

При использовании этого метода воспроизводимый выход мутантной ДНК составляет около 45% (без предварительного обогащения ковалентно замкнутой кольцевой ДНК для трансфекции). Выход достаточно высок для того, чтобы можно было обойтись без скрининга большого числа клонов. В отсутствие легкоузнаваемого фенотипа наиболее экономный путь скрининга для небольшого числа клонов — это прямой анализ последовательности ДНК.

1.6. Ограничения метода

Описанный выше метод направляемого олигонуклеотидом мутагенеза имеет ряд общих и частных ограничений.

1. Присутствие в последовательности-мишени повторов может приводить к трудностям с отжигом затравки. Прямые повторы приводят к неоднозначному выбору затравкой участка гибридизации. Обращенные повторы могут образовывать шпильчатые структуры, что приводит к невозможности отжига затравки.

2. Не все неспаренные участки ДНК подвержены зависящей от метилирования репарации в равной степени [13, 15]. Поэтому, хотя описанный здесь метод во всех случаях предотвращает невыгодно направленную репарацию неспаренных участков, не следует рассчитывать, что нужным образом направленная репарация будет в каждом случае приводить к повышению выхода мутантной ДНК (в сравнении с пассивным разделением цепей).

2. Экспериментальные методики

2.1. Синтетическая затравка

Синтетические олигонуклеотиды, используемые для мутагенеза, должны быть максимально чистыми и количественно фосфорилированы по 5'-концам. Такие олигонуклеотиды можно синтезировать разными химическими методами или получить из нескольких коммерческих источников. В серии «Practical approach» имеется книга, целиком посвященная препаративным и аналитическим аспектам химического синтеза олигонуклеотидов [19].

Исходя из накопленного опыта, можно сформулировать следующие требования к мутагенной затравке.

1. *Длина затравки.* Мутагенная затравка состоит из основной последовательности, остающейся неспаренной после отжига с геномом M13, и двух фланкирующих последовательностей, необходимых для образования стабильного и специфичного двухцепочечного комплекса. При нормальном содержании G+C и длине неспаренной последовательности только в один

нуклеотид длина обеих фланкирующих последовательностей должна быть приблизительно 6—7 нуклеотидов. Эти последовательности должны быть длиннее, если они обогащены А+Т и (или) если длина неспаренной центральной области превышает 1 нуклеотид.

2. *Последовательности вблизи концов затравки.* Плохое спаривание концов отожженной с матрицей затравки мешает действию ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы. В частности, по косвенным данным, полученным в лаборатории автора, 5'-конец затравки может легко смещаться, что приводит к вредным последствиям (Б. Крамер, В. Крамер, Х. Фриц, неопубликованные данные). Желательно, чтобы концевые последовательности затравки содержали один или несколько остатков G или C.

2.2. Получение частично дуплексной ДНК

Гемиметилированную чдДНК получают из неметилированной одноцепочечной рекомбинантной ДНК и метилированной РФ-ДНК вектора M13. Их получение описано в работе [4]. В таблицах 1—4 приведена несколько модифицированная версия этих методов.

Приготовив эти препараты, согласно табл. 5, получают чдДНК. На рис. 1 представлены результаты электрофореза различных промежуточных продуктов этого процесса. Отметим, что чдДНК мигрирует в геле медленнее, чем любой из двух исходных компонентов.

2.3. Получение мутаций

При наличии гемиметилированной чдДНК мутагенез проводят в четыре стадии (табл. 6, 7).

1. Отжиг мутагенной затравки с чдДНК.
2. Достройка брешей и сшивание цепей при помощи ДНК-полимеразы и ДНК-лигазы.
3. Трансфекция *E. coli* и получение смешанной популяции фагов.
4. Реинфекция *E. coli* смешанной популяцией при очень низкой множественности заражения для обеспечения полной сегрегации маркеров.

2.4. Анализ

Полученные индивидуальные фаговые клоны необходимо проверить на присутствие желаемой мутации. Удобнее всего сделать это с помощью прямого анализа последовательности ДНК небольшого числа клонов-кандидатов. Для анализа последовательности ДНК в рекомбинантных геномах M13 больше всего подходит метод терминации цепей, разработанный

Таблица 1. Получение неметилированной одноцепочечной ДНК рекомбинантного фага (оцДНК)

1. Инкубируйте 2—3 мл жидкой культуры *E. coli* GM99-F2su_{III}¹⁾ в течение ночи при 32°C в среде с антибиотиком № 3 (Antibiotic Medium 3, Difco).
2. Внесите инокулят в 200 мл той же среды (в 1 л колбе Эрленмейера). Добавьте 0,1—0,2 мл суспензии фага²⁾ с титром около 10¹² б.о.е/мл³⁾. Инкубируйте в течение ночи на качалке при 32°C.
3. Отберите 1,5 мл в микроцентрифужную пробирку для проверки фенотипа Dam⁻ (табл. 2) и определения титра фага (табл. 3).
4. Остальную культуру перенесите в 250 мл пластиковый центрифужный стакан с закручивающейся крышкой и отцентрифугируйте 30 мин при 10 000 об/мин в роторе Sorvall GSA или подобном при 4—15°C.
5. Перенесите надосады в новый центрифужный стакан, добавьте 8 г ПЭГ 6000 (полиэтиленгликоль) и 6 г NaCl (конечная концентрация 0,5 М). Растворите ПЭГ и NaCl, проинкубируйте смесь при 4°C не менее 4 ч для осаждения фага⁴⁾.
6. Соберите фаг центрифугированием в течение 20—30 мин при 10 000 об/мин и 4°C в роторе Sorvall GSA или подобном. Тщательно удалите надосады, дайте остаткам жидкости стечь, поставив стакан на 10 мин на бумажное полотенце.
7. С помощью пипетки на 10 мл суспендируйте осадок фага в 20 мл 10 мМ трис-HCl pH 8,0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА. Перенесите суспензию в пластиковую центрифужную пробирку на 40 мл. Промойте стакан еще 10 мл буфера и объедините с первой порцией.
8. К 30 мл суспензии добавьте 0,6 г ПЭГ и 0,9 г NaCl. Растворите и выдержите при 4°C не менее 1 ч.
9. Отцентрифугируйте 10 мин при 15 000 об/мин и 4°C в роторе Sorvall SS 34 или эквивалентном. Осторожно удалите надосады и просушите пробирку на бумажном полотенце примерно 10 мин.
10. Пипеткой на 1 мл ресуспендируйте осадок фага в 2 мл 10 мМ трис-HCl pH 8,0; 50 мМ NaCl; 1 мМ ЭДТА. Перенесите суспензию в 14 мл полипропиленовую пробирку с крышкой. Промойте центрифужную пробирку 1 мл буфера и объедините с первой суспензией.
11. Добавьте 3 мл фенола, насыщенного 10 мМ трис-HCl pH 8,0; 0,2 мМ ЭДТА, энергично перемешайте на механическом встряхивателе и отцентрифугируйте 10 мин при 6000 об/мин и комнатной температуре.
12. Повторите экстракцию водной фазы равным объемом смеси фенола с хлороформом (1:1).
13. Трижды экстрагируйте водную фазу диэтиловым эфиром. После третьей экстракции удалите эфир и высушите его остатки 15—30 мин при 65°C⁵⁾.
14. Измерьте объем водной фазы, добавьте 1/10 объема 3 М ацетата натрия и три объема этанола (—20°C). Выдержите не менее часа при —20°C.
15. Соберите ДНК центрифугированием в роторе Sorvall SS34 в течение 20 мин при 15 000 об/мин и 0°C. Осторожно слейте надосады и подсушите пробирку 10 мин на бумажном полотенце. Высушите осадок в вакуумном эксикаторе.
16. Растворите осадок в 2 мл 10 мМ трис-HCl pH 8,0; 0,25 мМ ЭДТА и определите выход ДНК⁶⁾. ДНК храните при +4 или —20°C.

¹⁾ Генотип *E. coli* GM99-F2su_{III} — *dam4*, *mal354*, *tsx*, *su_{III}* (φ80); *F'gal/T::Tn5* (*kan^r*).

²⁾ Препараты фага получают на *E. coli* BMH71-18 [$\Delta(lac-pro)$, *thi*, *supE*; *F'lac*, *ZAM15*, *proA+B+*].

³⁾ Определение титра фаговых препаратов описано в табл. 3.

⁴⁾ На этой стадии удобно проверить фенотип Dam⁻ (табл. 2) и оттитровать фаг (табл. 3).

⁵⁾ Не держите эфир вблизи открытого огня или электрических выключателей.

⁶⁾ Выход ДНК составляет обычно 300—1000 мкг/200 мл культуры. Для фагов с *amber*-мутациями, таких, как M13mp8 или M13mp9, выход может быть ниже.

Таблица 2. Проверка фенотипа *Dam*⁻

1. 1,5 мл суспензии клеток и фага (стадия 3, табл. 1) отцентрифугируйте 1 мин в микроцентрифуге. Надосадок отберите пастеровской пипеткой — он понадобится для титрования фага (табл. 3).
2. Встряхивая пробирку вручную или на механическом встряхивателе, суспендируйте осадок клеток при 0°C в 100 мкл 50 мМ раствора глюкозы; 10 мМ ЭДТА; 25 мМ трис-НСl рН 8,0, к которому перед использованием добавлен лизоцим до 4 мг/мл. Проинкубируйте 5 мин при комнатной температуре¹⁾.
3. Добавьте 200 мкл свежеприготовленного 0,2 н. NaOH, 1% SDS и смешайте, перевернув пробирку 2—3 раза.
4. Выдержите пробирку 5 мин на льду и добавьте 150 мкл охлажденного 3 М раствора ацетата калия (рН 4,8, подводится 98—100%-ной уксусной кислотой). Осторожно перемешайте пробирку на встряхивателе в перевернутом положении и поместите еще на 5 мин в лед.
5. Отцентрифугируйте 5 мин при 4°C в микроцентрифуге.
6. Перенесите надосадок в чистую пробирку и добавьте равный объем смеси фенола с хлороформом (1:1 по объему). Перемешайте на встряхивателе и отцентрифугируйте 2 мин в микроцентрифуге.
7. Перенесите надосадок (водную фазу) в чистую пробирку, добавьте 2 объема этанола и 0,1 объема 3 М ацетата натрия. Смешайте и выдержите 2 мин при комнатной температуре.
8. Отцентрифугируйте 5 мин в микроцентрифуге. Оттянутой пастеровской пипеткой осторожно удалите надосадок. Добавьте 1 мл 70%-ного этанола, перемешайте и отцентрифугируйте снова 5 мин в микроцентрифуге.
9. Удалите надосадок так, как указано выше, и высушите осадок в вакуумном эксикаторе.
10. Растворите осадок в 20 мкл 10 мМ трис-НСl рН 8,0; 0,25 мМ ЭДТА, содержащем 20 мкг/мл свободной от ДНКаз панкреатической РНКазы. Добавьте 3 мкл 500 мМ NaCl; 100 мМ трис-НСl рН 7,5; 100 мМ MgCl₂; 10 мМ ДТТ и 6 мкл воды. Добавьте 1 мкл *Mbo*I (10 ед/мкл) и проинкубируйте 1 ч при 37°C.
11. Проанализируйте ДНК гель-электрофорезом в 1—1,5%-ной агарозе. Причины отсутствия рестрикции могут быть следующими: 1) реверсия штамма-хозяина к фенотипу *Dam*⁺; 2) неактивная рестриктаза; 3) низкое качество препарата ДНК.

¹⁾ Эта и последующие стадии выделения ДНК представляют собой вариант методики, разработанной Бирибоймом и Доли и описанной на стр. 368—369 работы [20].

Таблица 3. Определение титра фага

1. Надосадок со стадии 1 табл. 2 разбавьте в 10³, 10⁶ и 10⁹ раз 20 мМ фосфатом натрия, рН 7,2, содержащим 0,002% желатина.
2. Поместите четыре стерильные стеклянные пробирки объемом 12 мл, содержащие по 2,5 мл полностью расплавленного верхнего агара¹⁾, в водяную баню с температурой 45°C. Когда агар остынет до 45°C, внесите стерильной 1 мл пипеткой в каждую пробирку по 2 капли свежей ночной культуры *E. coli* BMH71-18²⁾.
3. Добавьте по 100 мкл соответствующего разведения фага. Перемешайте на встряхивателе и вылейте верхний агар на чашки с ЕНА-агаром³⁾. Четвертую пробирку (без фага) рассейте тем же способом для контроля на загрязнение штамма.
4. Дайте агару застыть (около 20 мин при комнатной температуре) и проинкубируйте чашки вверх дном не менее 6 ч при 37°C.
5. Подсчитайте бляшки и определите титр фага. Выделение фаговой ДНК (табл. 1) стоит продолжать, если титр составляет не менее 5·10¹¹ б.о.е/мл.

Если фаг в жизненноважных генах содержит *amber*-кодоны (например, фаги M13mp8 и M13mp9), можно работать и с несколько меньшим титром.

¹⁾ Верхний агар содержит (на 1 л воды) 10 г бакто-триптона (Difco); 5 г NaCl; 6,5 г бакто-агара (Difco) и 1 мл 1 М MgSO₄.

²⁾ Генотип *E. coli* BMH 71-18 приведен в примечании 2 к табл. 1.

³⁾ ЕНА-агар готовят, растворяя 13 г бакто-триптона (Difco), 8 г NaCl, 2 г цитрата натрия (дигидрата) и 10 г бакто-агара в литре воды. Смесь автоклавируют и добавляют 7 мл стерильного 20%-ного раствора глюкозы. Агар следует разлить по чашкам Петри диаметром 9 см за несколько дней до использования.

Таблица 4. Приготовление метилированной РФ-ДНК вектора

1. Вырастите 75 мл ночной культуры *E. coli* BMH 71-18¹⁾ в среде с антибиотиком № 3 (Difco) при 37°C. Разлейте 3 л среды с антибиотиком № 3 в три стерильные колбы Эрленмейера объемом 2 л. Засейте каждую колбу 25 мл ночной культуры BMH 71-18 и инкубируйте при 37°C со встряхиванием до ОП₅₄₆ = 0,5—0,6.
2. К каждой культуре добавьте 25 мл фаговой суспензии²⁾ с титром около 10¹² б.о.е/мл и продолжайте инкубацию при 37°C еще 3—4 ч.
3. Соберите клетки центрифугированием. Слейте надосадок и при помощи 10 мл пипетки суспендируйте клетки при 0°C в 22,5 мл 25%-ной сахарозы; 50 мМ трис-НСl рН 8,0. Если клетки центрифугировали в нескольких стаканах, добавьте в первый 22,5 мл буфера, суспендируйте клетки, перенесите суспензию в следующий стакан и так далее.
4. Добавьте 6 мл раствора лизоцима (5 мг/мл в 50 мМ трис-НСl рН 8,0) и проинкубируйте, плавно покачивая, 10 мин при 0°C.
5. Внесите 7,5 мл 250 мМ ЭДТА рН 8,0 и проинкубируйте еще 10 мин при 0°C.
6. Добавьте 27,5 мл 50 мМ трис-НСl рН 8,0, 1% Brij 58³⁾; 0,4% дезокси-холата натрия; 62,5 мМ ЭДТА и снова проинкубируйте 10 мин при 0°C с плавным покачиванием.
7. Осторожно перенесите мутную и вязкую смесь в стаканчик с завинчивающейся крышкой для ротора Beckman type-30 или эквивалентного и центрифугируйте 60 мин при 4°C и 30 000 об/мин.
8. Соберите надосадок в мерный цилиндр объемом 100 мл, стараясь не захватить вязкого осадка. Добавьте на 1 мл надосадка 0,97 г CsCl и 20 мкл раствора этидиумбромид (10 мг/мл).
9. Разделите раствор поровну между двумя 35 мл центрифужными пробирками типа «quick-seal». Заполните пробирку доверху буфером для уравнивания⁴⁾. Закройте пробирки в соответствии с инструкцией изготовителя и отцентрифугируйте не менее 14 ч при 45 000 об/мин и 15°C в роторе Beckman VTi50 или эквивалентном.
10. После центрифугирования должны появиться две (иногда три) зоны, соответствующие одна — линейной и кольцевой релаксированной ДНК, а другая — сверхспиральной ДНК. (Иногда наблюдающаяся третья зона соответствует одноцепочечной ДНК.) Чтобы обеспечить доступ воздуха в процессе отбора зон, воткните в верхнюю часть пробирки иглу от шприца. Проткните стенку пробирки с помощью шприца чуть ниже верхней зоны (зон) и отсосите ее. Не удаляя шприца, проткните стенку пробирки другой иглой со шприцем чуть ниже самой нижней зоны, содержащей сверхспиральную ДНК, и соберите содержимое этой зоны в объеме 5 мл (на одну пробирку).
11. Перенесите отобранный материал (по 5 мл) в две пробирки на 5 мл («quick-seal») и отцентрифугируйте 18 или более часов при 45 000 об/мин и 15°C в роторе Beckman VTi65 или эквивалентном.
12. Соберите зоны сверхспиральной ДНК, как описано в пункте 10, но в объеме 1—2 мл и отдиализуйте против 1000 объемов 10 мМ трис-НСl рН 8,0; 50 мМ NaCl; 1 мМ ЭДТА.
13. Перенесите раствор ДНК в 14 мл полипропиленовую пробирку с крышкой и добавьте равный объем фенола, насыщенного 10 мМ трис-НСl рН 8,0; 0,25 мМ ЭДТА. Смешайте на встряхивателе и разделите фазы

центрифугированием. Перенесите верхнюю (водную) фазу в новую пробирку и повторите экстракцию еще дважды.

14. Экстрагируйте водную фазу трижды двумя объемами диэтилового эфира. После удаления эфира прогрейте водную фазу 15–30 мин при 65 °С³⁾. Отдиализуйте 2–3 раза против 1000 объемов 10 мМ трис-НСl pH 8,0; 50 мМ NaCl; 1 мМ ЭДТА.

15. Определите выход ДНК⁶⁾ спектрофотометрически, используя для сравнения последний диализный буфер. Соотношение поглощенной A_{260}/A_{280} должно быть близко к 2,0. Храните ДНК при –20 °С.

- 1) Штамм *E. coli* BMH 71-18 описан в примечании 2 к табл. 1.
- 2) Суспензия фага готовится так, как указано в пунктах 1–4 таблицы 1.
- 3) Brij 58 представляет собой моностеариловый эфир полиэтиленгликоля.
- 4) Раствор для уравнивания: это 50 мМ трис-НСl pH 8,0, на каждый миллилитр которого добавлены 0,97 г CsCl и 20 мкл раствора этидиумбромид (10 мг/мл).
- 5) См. примечание 5 к табл. 1.
- 6) Выход должен составлять от 100 до 400 мкг РФ-ДНК с 1 литра культуры.

Таблица 5. Приготовление частично дуплексной ДНК (чдДНК)

1. Расщепите 5 мкг метилированной РФ-ДНК вектора M13 рестриктазой (рестриктазами), использовавшимися для клонирования фрагмента-мишени мутагенеза. При помощи электрофореза небольшой аликвоты в 0,8%-ном агарозном геле¹⁾ убедитесь, что РФ-ДНК полностью перешла в линейную форму.

2. Смесь после рестрикции экстрагируйте дважды фенолом, насыщенным буфером TE²⁾, четыре раза эфиром, осадите ДНК этанолом и соберите центрифугированием³⁾.

3. Осадок линеаризованной ДНК растворите в буфере TE при конечной концентрации 0,5 мг/мл.

4. В микроцентрифужной пробирке на 1,5 мл смешайте 5 мкг (1 пМ) линеаризованной РФ-ДНК с 12,5 мкг (5 пМ) неметилированной оцДНК рекомбинантного фага. Добавьте 7 мкл раствора 10×SSC⁴⁾ и доведите объем водой до 70 мкл.

5. Выдержите пробирку 7 мин в кипящей водяной бане. Чтобы крышка не открылась, ее можно прижать, положив на пробирку предварительно прогретый металлический брусок. Перенесите пробирку на 10 мин в баню с температурой 65 °С.

6. Охладите пробирку до 0 °С, добавьте 30 мкл буфера для нанесения⁵⁾ и перемешайте 10 с на механическом встряхивателе. Нанесите в широкую лунку на 1%-ный агарозный гель⁶⁾. В отдельную небольшую лунку нанесите маркер (250 нг РФ-ДНК) и проведите электрофорез 16 ч при 30 В⁷⁾. Окрасьте гель в водном растворе этидиумбромид (1 мкг/мл). Видимые при УФ-освещении три зоны соответствуют одноцепочечной ДНК, линеаризованной РФ-ДНК и движущейся медленнее всех чдДНК.

7. Вырежьте полосу геля, содержащую зону чдДНК (мигрирует вместе с релаксированной РФ-ДНК маркера). Вырежьте в геле окошко, несколько большее по размеру, чем вырезанная полоса, и проложите его диализной мембраной. Положите в это окошко полоску геля с чдДНК и залейте электрофоретическим буфером так, чтобы он слегка покрывал полоску. Подайте напряжение (150–200 В) и дождитесь, пока весь окрашенный материал не выйдет из вырезанной полосы (обычно около 30 мин). На 30 с измените полярность напряжения.

8. Соберите буфер, содержащий чдДНК. При необходимости препарат можно сконцентрировать до 400–500 мкл, встряхивая его с *n*-бутанолом либо с помощью лиофилизации.

9. Дважды экстрагируйте раствор ДНК насыщенным TE фенолом, один раз — смесью фенол/хлороформ (1:1 по объему) и 4 раза — диэтиловым эфиром. Удалите остатки эфира при 65 °С⁸⁾.

10. Дважды осадите ДНК этанолом⁹⁾. Растворите осадок ДНК в 20 мкл буфера TE.

Продолжение

11. Отберите аликвоту в 1 мкл и нанесите на 1%-ный агарозный гель. Нанесите на тот же гель 1 мкг, 500, 250 и 62,5 нг ДНК фага λ , расщепленной *Hind*III, и 250 нг РФ-ДНК. Проведите электрофорез 2–4 ч при 60 В. Оцените выход ДНК, сравнивая интенсивность полосы чдДНК с интенсивностью полосы 9,3 т.п.н. λ -ДНК, расщепленной *Hind*III. Полоса длиной 9,3 т.п.н. содержит $1/5$ всей λ -ДНК. Храните раствор чдДНК при –20 °С.

- 1) УФ-фотография такого геля представлена на рис. 1.
- 2) TE содержит 10 мМ трис-НСl pH 8,0; 0,25 мМ ЭДТА.
- 3) См. стадии 13–14 табл. 1.
- 4) 10×SSC — это 1,5 М NaCl; 0,15 М цитрат натрия.
- 5) Буфер для нанесения содержит 60% сахарозы; 0,05% бромфенолового синего; 0,05% ксилолпанола FF; 90 мМ трис-боратного буфера pH 8,3; 2,5 мМ ЭДТА.
- 6) Размер геля — 123 мм×82 мм×5 мм, размер лунки для нанесения — 1,4 мм×31 мм×3,5 мм.
- 7) Электрофоретический буфер содержит 40 мМ трис-ацетата pH 7,4; 5 мМ ацетата натрия; 1 мМ ЭДТА.
- 8) См. примечание 5 к табл. 1.
- 9) См. стадии 7–9 табл. 2.

Ф. Сэнгером и соавт. [16, 17]. Для анализа последовательности этим методом, однако, необходимо синтезировать еще одну олигонуклеотидную затравку.

В таблицах 8 и 9 приведена слегка модифицированная в сравнении с опубликованной [17] методика определения последовательности ДНК. Если выход генетического маркера

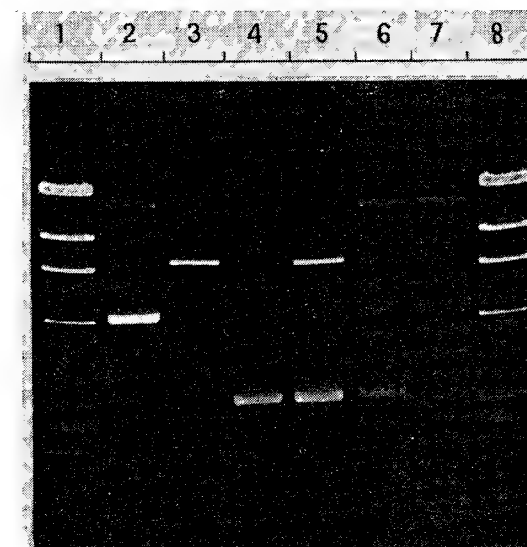


Рис. 1. Электрофоретический анализ промежуточных продуктов конструирования чдДНК. Дорожки 1 и 8 — расщепленная *Hind*III λ -ДНК; дорожка 2 — РФ-ДНК M13mp2; дорожка 3 — укороченная линеаризованная РФ-ДНК M13mp2 (расщепленная *Eco*RI и *Pvu*I); дорожка 4 — одноцепочечная ДНК M13mp2; дорожка 5 — смесь ДНК дорожек 3 и 4; дорожка 6 — та же смесь, что в дорожке 5, после денатурации — ренатурации; дорожка 7 — очищенная чдДНК. Получение препаратов ДНК и электрофорез описаны в табл. 5.

Таблица 6. Гибридизация чДНК с мутагенной затравкой. Обработка лигазой и полимеразой

1. В микроцентрифужной пробирке на 1,5 мл смешайте 20 фмоль (100 нг) чДНК и 400 фмоль мутагенной затравки. Добавьте 2 мкл 5×буфера для гибридизации¹⁾ и доведите объем до 10 мкл водой.
2. Инкубируйте смесь 7 мин при 65°C, крышку пробирки прижмите предварительно прогретым металлическим бруском.
3. Охлаждайте смесь 5—15 мин при комнатной температуре, а затем охладите при 0°C.
4. Добавьте 2 мкл воды и 4 мкл 10×буфера для достройки²⁾. Смешайте и добавьте 2 мкл ДНК-лигазы T4 (2 ед/мкл)³⁾ и 1 мкл большого фрагмента ДНК-полимеразы (0,2 ед/мкл)⁴⁾.
5. Проинкубируйте смесь 45 мин при комнатной температуре, затем остановите реакцию добавлением 1 мкл 0,5 М ЭДТА и прогревом при 65°C в течение 10 мин.
6. Экстрагируйте смесь 1 раз 40 мкл фенола, насыщенного ТЕ⁵⁾, и трижды диэтиловым эфиром. Удалите остатки эфира при 65°C⁶⁾.
7. До начала трансфекции (см. табл. 7, стадии 3—7) храните препарат во льду. Долго хранить препарат не следует.

¹⁾ Буфер для гибридизации содержит 750 мМ KCl; 50 мМ трис-HCl pH 7,5.

²⁾ 10×буфер для достройки содержит 625 мМ KCl; 275 мМ трис-HCl pH 7,5; 150 мМ MgCl₂; 20 мМ ДТТ; 0,5 мМ АТР и по 0,25 мМ каждого из четырех дезоксиуклеозидтрифосфатов.

³⁾ 1 единица ДНК-лигазы T4 — это количество фермента, необходимое для 50%-ного лигирования расщепленной HindIII λ-ДНК за 30 мин при 16°C и концентрации 5'-концов 0,12 мМ.

⁴⁾ 1 единица ДНК-полимеразы катализирует включение 10 нмоль нуклеотида за 30 мин при использовании polyd(AT) в качестве затравки. Фермент можно разбавить 50 мМ калий-фосфатным буфером pH 7,5 с 50% глицерином.

⁵⁾ См. примечание 2 к табл. 5.

⁶⁾ См. примечание 5 к табл. 1.

Таблица 7. Трансфекция и разделение цепей

1. Засейте 50 мл среды с антибиотиком № 3 (Difco) 1 мл ночной культуры *E. coli* BMH 71-18¹⁾. Инкубируйте при 37°C со встряхиванием до $OP_{546}=0,6$.
2. Соберите клетки центрифугированием при 6000 об/мин и 4°C в роторе Sorvall SS34 или эквивалентном. Ресуспандируйте клетки в 20 мл охлажденного во льду 100 мМ CaCl₂ и отцентрифугируйте снова. К осадку добавьте 10 мл 100 мМ CaCl₂. Снова осадите клетки центрифугированием и ресуспандируйте их в 2 мл охлажденного во льду 100 мМ CaCl₂. Выдержите клетки на льду не менее 30 мин.
3. Добавьте к реакционной смеси (табл. 6, стадия 7) 60 мкл охлажденного во льду 100 мМ CaCl₂, затем 200 мкл суспензии клеток с предыдущей стадии. Выдержите смесь 90 мин во льду.
4. Быстро перемешайте суспензию и проинкубируйте 3 мин при 45°C.
5. Отберите 20 мкл суспензии и приготовьте 10⁻¹- и 10⁻²-кратные разведения ее в 100 мМ CaCl₂. 100 мкл каждого из этих разведений используйте для определения эффективности трансфекции так, как описано в табл. 3, но инкубируйте чашки в течение ночи.
6. Остатком смеси для трансфекции (280 мкл) засейте 25 мл среды с антибиотиком № 3 и проинкубируйте при 37°C со встряхиванием в течение ночи.
7. В микроцентрифужную пробирку отберите аликвоту культуры и отцентрифугируйте 5 мин. Соберите надосадок и определите титр фага (см. табл. 3). Храните надосадок при 4°C.

¹⁾ Генотип *E. coli* BMH 71-18 описан в примечании 2 к табл. 1.

Таблица 8. Приготовление матрицы для анализа последовательности

1. Засейте 100 мл среды с антибиотиком № 3 1 мл ночной культуры *E. coli* BMH 71-18¹⁾. Разлейте по 2,5 мл в стерильные культуральные пробирки объемом 15 мл.
2. Случайным образом отберите несколько бляшек, полученных на стадии 7 табл. 7. Используйте для этого тонкие стерильные стеклянные капилляры, например капиллярные микропипетки объемом 200 мкл. Содержимое бляшек внесите в культуральные пробирки.
3. Проинкубируйте со встряхиванием 5 ч при 37°C. Отберите по 1,5 мл каждой культуры в микроцентрифужные пробирки и отцентрифугируйте 5 мин. Остаток культуры сохраните (см. стадию 13).
4. Автоматической пипеткой отберите по 1 мл надосадка. Чтобы не захватить осадка, наконечник пипетки вводите по стенке, противоположной той, на которой находится осадок клеток.
5. Снова отцентрифугируйте надосадок (5 мин). Отберите 800 мкл надосадка в новые пробирки с теми же предосторожностями, что и на стадии 4.
6. К 800 мкл надосадка добавьте 200 мкл 2,5 М NaCl, 20% ПЭГ 6000. Смешайте и оставьте на 15 мин при комнатной температуре.
7. Отцентрифугируйте 5 мин и осторожно удалите надосадок пастеровской пипеткой. Просушите края пробирки бумажным полотенцем. Отцентрифугируйте 2 мин и удалите все оставшиеся следы надосадка оттянутым капилляром.
8. К осадку добавьте 110 мкл ТЕ²⁾, а затем 50 мкл насыщенного ТЕ фенола. Перемешайте на механическом встряхивателе (Wortex) 15—20 с. Поставьте пробирки во встряхиватель типа Эппендорф на 10 мин (при комнатной температуре), а затем снова на 15 с во встряхиватель Wortex. Отцентрифугируйте 3 мин и перенесите верхнюю (водную) фазу в чистую пробирку.
9. Добавьте 100 мкл хлороформа, перемешайте механически и отцентрифугируйте 2 мин. Перенесите 90 мкл водной (верхней) фазы в чистую пробирку.
10. Добавьте 10 мкл 3 М ацетата натрия и 300 мкл охлажденного до —20°C этанола. Выдержите не менее часа при —20°C.
11. Отцентрифугируйте 15 мин при 15 000 об/мин и 4°C в роторе Sorvall SS34 или эквивалентном. Удалите надосадок оттянутой пастеровской пипеткой. Добавьте 1 мл холодного этанола и перемешайте механически в течение 10 с на встряхивателе типа Wortex. Отцентрифугируйте снова. Удалите надосадок пастеровской пипеткой и высушите осадок (обычно невидимый) в вакуумном эксикаторе.
12. Растворите осадок в 25 мкл буфера ТЕ и храните ДНК при —20°C. При возможности перед использованием проанализируйте ДНК-матрицу электрофорезом в 1%-ном агарозном геле. Для оценки концентрации выделенной ДНК нанесите рядом ДНК M13 с известной концентрацией и сравните интенсивности свечения зон в ультрафиолете. Не используйте ДНК-матрицу, содержащую в заметных количествах минихромосомы или тРНК, так как при этом на геле для определения последовательности могут появиться дополнительные полосы.
13. Чтобы сохранить клоны, перенесите оставшийся 1 мл каждой из инфицированных культур (стадия 3) в микроцентрифужную пробирку. Отцентрифугируйте 5 мин в микроцентрифуге и перенесите надосадок в чистую пробирку. Не старайтесь перенести надосадок количественно. Суспензию фага храните при 4°C.

¹⁾ Генотип *E. coli* BMH 71-18 описан в примечании 2 к табл. 1.

²⁾ См. примечание 2 к табл. 5.

Таблица 9. Анализ последовательности ДНК методом терминации цепи

1. Приготовьте 0,5 мМ растворы dATP, dGTP и dTTP и с их помощью приготовьте следующие четыре смеси (мкл):

	A°	C°	G°	T°
0,5 мМ dATP	1	20	20	20
0,5 мМ dGTP	20	20	1	20
0,5 мМ dTTP	20	20	20	1
Вода	20	20	20	20

2. Приготовьте растворы 2',3'-дидезоксинуклеозид-5'-трифосфатов: 0,1 мМ ddATP; 0,1 мМ ddCTP; 0,3 мМ ddGTP и 0,5 мМ ddTTP.

3. Смешайте равные объемы A° и 0,1 мМ ddATP; C° и 0,1 мМ ddCTP; G° и 0,3 мМ ddGTP; T° и 0,5 мМ ddTTP. Далее эти растворы называются A-, C-смесью и т. д.

4. Приготовьте смесь всех четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов, каждый в концентрации 0,25 мМ.

5. Отожгите затравку с матрицей. Для этого в микроцентрифужной пробирке смешайте 250 нг (100 фмолей) ДНК-матрицы (обычно 2,5 мкл ДНК, приготовленной согласно табл. 8), 100—200 фмолей затравки для секвенирования ДНК (растворенной в 1—4 мкл) и 1 мкл буфера (500 мМ NaCl, 100 мМ трис-HCl pH 7,5; 100 мМ MgCl₂; 10 мМ ДТТ). Доведите объем до 10 мкл водой. Прогрейте смесь 5 мин при 65 °С. Медленно (в течение 1—2 ч) дайте смеси остыть до 20—30 °С. Перенесите в лед.

6. Пока смесь остывает, приготовьте денатурирующий полиакриламидный гель с градиентом буфера так, как описано в работе [21].

7. Приготовьте по пробирке для каждой из четырех реакций и надпишите их G, A, T и C. Добавьте в них соответственно по 2 мкл G-, A-, T- и C-смеси.

8. К смеси матрицы с затравкой добавьте 1 мкл [α -³²P] dCTP (400 Ки/ммоль; 10 мКи/мкл) и 1 мкл фрагмента Кленова ДНК-полимеразы (1 ед/мкл)¹⁾.

9. Нанесите по 2,5 мкл этой смеси на край каждой из четырех реакционных пробирок. Начните реакцию, «посадив» капли на дно в микроцентрифуге.

10. После 15 мин инкубации при комнатной температуре добавьте тем же способом (стадия 9) по 1 мкл смеси четырех нуклеотидов (стадия 4) и проинкубируйте еще 15 мин при комнатной температуре.

11. Остановите реакцию²⁾, добавив 45 мкл 3 М ацетата натрия и 250 мкл холодного этанола. Смешайте и поместите на 30 мин в холодильник (—20 °С).

12. Отцентрифугируйте пробирки 15 мин при 15 000 об/мин и 0 °С в роторе Sorvall SS34 или эквивалентном. Удалите надосадок оттянутой пастеровской пипеткой.

13. Отцентрифугируйте 1 мин в микроцентрифуге и удалите все остатки надосадка оттянутой капиллярной пипеткой.

14. Высушите осадок в вакуумном эксикаторе и растворите в 2 мкл 80%-ного формамида; 10 мМ NaOH; 1 мМ ЭДТА; 0,1% ксилолцианола FF; 0,1% бромфенолового синего. Прогрейте 2 мин при 95 °С и нанесите на денатурирующий полиакриламидный гель.

¹⁾ 1 единица фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I — это количество фермента, включающее 10 нмоль нуклеотидов в кислотонерастворимую фракцию за 30 мин. Если концентрация фермента слишком велика, разбавьте его 50 мМ калий-фосфатным буфером pH 7,2 с 50% глицерином.

²⁾ Другой метод остановки реакции (после стадии 10) — добавить 6 мкл деионизованного формамида, содержащего 0,3% ксилолцианола FF; 0,3% бромфенолового синего и 20 мМ ЭДТА. Прогрейте 3 мин при 95 °С и нанесите 2 мкл на денатурирующий полиакриламидный гель.

невысок, можно провести только одну из четырех реакций определения последовательности, что позволит проанализировать на одном геле более 12 клонов.

Обнаружив содержащий мутацию клон, необходимо провести полный анализ последовательности, находившейся в чдДНК в одноцепочечной форме или, еще лучше, последовательности всего исследуемого гена, так как при работе ДНК-полимеразы *in vitro* возможны ошибки. Иногда обнаруживаются клоны, содержащие дополнительные мутации (Б. Крамер, неопубликованные данные).

Благодарности

Многие описанные здесь методики обязаны появлением моим коллегам — У. Крамеру, В. Друтсу. Б. Крамеру и М. Пфлюгфельдеру. Работа финансировалась Deutsche Forschungsgemeinschaft через Sonderforschungsbereich 74.

Литература

1. Hutchinson C. A., III, Edgell M. H. J. Virol., 8, 181 (1971).
2. Zoller M. J., Smith M. Methods in Enzymology, 100, 468 (1983).
3. Wilkinson A. J., Fersht A. R., Blow D. M., Carter P., Winter G. Nature, 307, 187 (1984).
4. Messing J. Methods in Enzymology, 101, 20 (1983).
5. Kramer W., Schughart K., Fritz H.-J. Nucleic Acids Res., 10, 6475 (1982).
6. Loeb L. A., Kunkel Th. A. Annu. Rev. Biochem., 52, 429 (1982).
7. Wagner R. E., Jr., Meselson M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 4135 (1976).
8. Radman M., Wagner R. E., Jr., Glickman B. W., Meselson M. In: Developments in Toxicology and Environmental Sciences, Vol. 7, Progress in Environmental Mutagenesis, Alavic H. (ed.), Elsevier North Holland, Amsterdam, pp. 121 (1980).
9. Pukkila P. J., Peterson J., Harman G., Modrich P., Meselson M. Genetics, 104, 571 (1983).
10. Herman G. E., Modrich P. J. Biol. Chem., 257, 2605 (1982).
11. Beck E., Zink B. Gene, 16, 35 (1981).
12. van Wezenbeek P. M. G. F., Hulsebos T. J. M., Schoenmakers J. G. G. Gene, 11, 129 (1980).
13. Kramer B., Kramer W., Fritz H.-J. Cell (1984), in press.
14. Lu A.-L., Clark S., Modrich P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 4639 (1983).
15. Kramer W., Drutsa V., Janven H.-W., Kramer B., Pflugfelder M., Fritz H.-J. Nucleic Acids Res., 12, 944 (1984).
16. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977).
17. Walker J. E., Gay N. J. Methods in Enzymology, 97, 195 (1983).
18. Kornberg A. DNA Replication, W. H. Freeman, San Francisco, pp. 476, (1980).
19. Gait M. J. (ed.). Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, published by IRL Press, Ltd., Oxford, 1984.
20. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular Cloning, published by Cold Spring Harbor, New York, 1981. [Имеется русский перевод: Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984.]
21. Biggin M. D., Gibson T. J., Hong G. F. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 3963 (1983).

ВЕКТОРЫ ДЛЯ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ, ИМЕЮЩИЕ ШИРОКИЙ СПЕКТР ХОЗЯЕВ

Ф. Кристофер Х. Франклин

1. Введение

Метаболизм грамотрицательных бактерий характеризуется рядом особенностей, важных для сельского хозяйства, медицины, а также с точки зрения охраны окружающей среды. Например, бактерии *Rhizobium* способны фиксировать азот [1], *Thiobacillus* — окислять серу и железо [2], а *Pseudomonas* — метаболизировать экзотические органические соединения, такие, как нафталины, фенолы и галогениды [3]. В большинстве случаев генетический контроль этих процессов изучен слабо, в основном потому, что сами эти организмы часто недостаточно исследованы. Методы клонирования генов предоставляют мощный инструмент, позволяющий анализировать интересующие нас свойства бактерий и в конечном итоге использовать их в хозяйственных целях. Лучшее всего разработана система клонирования на *Escherichia coli*, ее плаزمиды и фагах. Эта система прекрасно подходит для грамотрицательных энтеробактерий, родственных *E. coli*, однако для других видов, таких, как *Pseudomonas*, ее применение ограничено. Имеющиеся данные указывают, что экспрессия в *E. coli* генов неродственных грамотрицательных бактерий происходит малоэффективно. Если, например, набор генов, участвующих в катаболизме толуола/ксилола, из *P. putida* mt-2 ввести целиком в *E. coli*, уровень их экспрессии составит лишь 1—5% от нормального уровня у *Pseudomonas* [4]. Следовательно, изучение экспрессии клонированных генов этих бактерий в *E. coli* затруднено. Кроме того, фаговые и плазмидные векторы, разработанные для *E. coli*, основаны на репликациях с узким спектром хозяев. Если источник гена не является энтеробактерией, реинтродукция клонированной ДНК для изучения экспрессии в естественного хозяина часто невозможна. Такие эксперименты, однако, нередко необходимы, особенно если изучаемая активность в норме проявляется в особых условиях, к которым естественный хозяин гена приспособлен. *Thiobacillus ferrooxidans*, например, окисляет железо только в чрезвычайно кислой среде. Анализ генов грамотрицательных бактерий затруднен не только в *E. coli*. Сходная проблема возникает и при работе с генами дрожжей или бацилл. Решить эту проблему в большинстве случаев удавалось путем конструирования векторов, спо-

собных реплицироваться в соответствующем организме. В этой главе описаны разработка и применение плазмидных векторов, пригодных для широкого спектра грамотрицательных бактерий.

2. Плазмиды с широким спектром хозяев

Многие виды бактерий располагают собственными плазмидами и фагами, которые в принципе могут служить основой для конструирования векторов, пригодных для клонирования с использованием организма-хозяина. Однако для того, чтобы из исходного репликаона получить пригодный для работы вектор, требуются значительные усилия и немалое время. Поэтому конструировать для каждого изучаемого вида собственную векторную систему крайне нежелательно. К счастью, многие плазмиды грамотрицательных бактерий способны реплицироваться в широком спектре организмов. На основе таких плазмид, названных плазмидами с широким спектром хозяев, создано несколько векторов, пригодных для экспериментов по клонированию генов во многих, если не во всех, грамотрицательных бактериях.

Свойства некоторых плазмид с широким спектром хозяев приведены в табл. 1. Кроме общего свойства — неспецифичности в отношении хозяина — между ними имеются значительные различия. Представители таких плазмид обнаружены в нескольких группах несовместимости — P-1, P-4/Q, P-6, P-9 и W. Оказалось, что многие из них несут гены устойчивости к антибиотикам. Плаزمида RP1, например, кодирует устойчивость

Таблица 1. Некоторые плазмиды с широким спектром хозяев

Плазмиды	Группа несовместимости	Размер генома (т. п. н.)	Фенотипические характеристики ¹⁾
RK2, RP1, RP4, R68, R18	P-1	60	Ap, Km, Tc, Tra ⁺
RSF1010, R300B, R1162	P-4/Q	8,9	Su, Sm, Tra ⁻ , Mob ⁺
Sa	W	29,6	Km, Cm, Sp, Su, Tra ⁺
pVS1	Неклассифицирована	30	Hg, Su; не реплицируется в <i>E. coli</i>
RMS149	P-6	54	Cb, Gm, Sm, Su
pJP4	P-1	52	Hg; рост на 2,4-D
pWWO	P-9	117	рост на толуоле/ксилоле

¹⁾ Обозначения устойчивости к антибиотикам и фенотипических маркеров: Ap — ампициллин; Km — канамицин; Tc — тетрациклин; Su — сульфонамиды; Cm — хлорамфеникол; Sp — спектиномицин; Hg — ионы ртути; Gm — гентамицин; Tra⁺ — способность к переносу; Mob⁺ — способность к мобилизации конъюгативной плазмидой; 2,4-D — 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота.

к пенициллину, канамицину и тетрациклину. Впервые она была обнаружена как фактор, придающий штамму *P. aeruginosa* устойчивость к карбенициллину. Этот штамм ответствен за послеожоговые инфекции [5]. Известно, однако, что с плазмидами могут быть связаны и другие функции, например способность катаболизировать ароматические соединения. Плазмида rJP4, например, кодирует ферменты деградации 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты [6]. Некоторые из этих плазмид, в особенности RK2 (обозначаемая также RP1, RP4, R68 и R18) [5], способны передаваться при конъюгации, тогда как другие, например RSF1010 [7], нетрансмиссивны. Для обеспечения конъюгативного переноса плазмиды требуется большая кодирующая емкость ДНК, что в значительной степени объясняет сравнительно большие размеры RK2 (60 т.п.н.) и родственных ей плазмид. Как и следовало ожидать, нетрансмиссивные плазмиды обладают много меньшей молекулярной массой. Размер RSF1010, например, составляет 8,9 т.п.н. Естественно предположить, что небольшие плазмиды могли бы стать основой для конструирования малых векторов, однако, как мы увидим ниже, это не совсем так. Хотя наибольшее количество векторов разработано на основе incQ-плазмиды RSF1010 [7], имеются также векторы, полученные из значительно более крупных плазмид Sa (29,6 т.п.н.) и RK2 (60 т.п.н.) [5, 14, 15]. Схемы конструирования и методология использования различных векторных систем очень похожи, поэтому здесь будет рассмотрена подробно только одна из них — RSF1010. Другие системы будут лишь перечислены с указанием их особенностей.

2.1. Разработка векторов с широким спектром хозяев на основе плазмид incQ/W

Плазмиды incQ RSF1010, R300B и R1162 — это три почти идентичных нетрансмиссивных многокопийных реплика на длиной 8,9 т.п.н., кодирующие устойчивость к стрептомицину (Sm) и сульфонидам (Su). Имеются подробная физическая и функциональная карты RSF1010 (рис. 1). Картированы такие структурно-функциональные элементы плазмиды, как сайты рестрикции, участки связывания РНК-полимеразы, гены лекарственной устойчивости, область, определяющая способность к мобилизации (Mob), гены трех белков системы репликации (Rep A, B и C), участки начала вегетативной репликации (Ori) и репликации при конъюгативном переносе (Nic) [9, 10]. Для того чтобы репликон использовать в качестве вектора общего применения, в него необходимо было внести ряд модификаций. Так же, как и другие плазмиды с широким спектром хозяев, плазмида RSF1010 содержит лишь небольшое число уникальных сайтов рестрикции, пригодных для клонирования

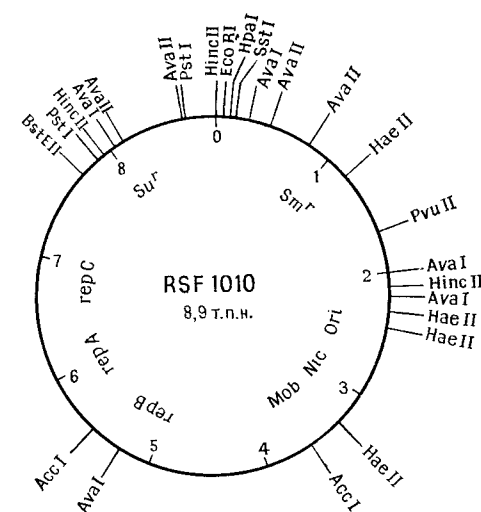


Рис. 1. Функциональная и рестриктивная карты плазмиды RSF1010. Сокращения: Su^r — устойчивость к сульфонидам; Sm^r — устойчивость к стрептомицину; гер A, B и C — гены репликации; Mob — способность к мобилизации; Nic — точка релаксирующего одноцепочечного разрыва; Ori — область начала репликации.

генов. Желательно было ввести в нее еще несколько дополнительных уникальных сайтов. Четыре потенциально пригодных для клонирования рестрикционных сайта Bst-EII, SstI, EcoRI и PstI (два сближенных участка) уже имелись в плазмиде. Однако для того, чтобы использовать три последние рестриктазы, необходимо было ввести в репликон RSF1010 дополнительный селективный маркер. Трудность заключалась в том, что гены устойчивости Su и Sm транскрибируются с одного и того же промотора [9, 11], поэтому введение фрагмента ДНК в сайт PstI инактивировало оба гена и нарушало устойчивость как к Su, так и к Sm. Клонирование в SstI-сайте нарушало устойчивость к Sm. Хотя EcoRI-сайт расположен вне кодирующей последовательности гена Sm, при введении в него фрагмента ДНК устойчивость к Sm терялась, если только вставка не содержала собственного промотора, с которого этот ген мог бы транскрибироваться. Хотя при клонировании в сайтах EcoRI и SstI устойчивость к Su сохранялась, этот селективный маркер далеко не идеален. В настоящее время путем введения в репликон RSF1010 фрагментов ДНК, кодирующих гены устойчивости к антибиотикам, сконструированы плазмидные векторы, пригодные для клонирования с помощью различных рестриктаз.

Таблица 2. Векторы с широким спектром хозяев

Вектор	Репликон	Размер (т.п.н.)	Сайты клонирования	Селективные маркеры ¹⁾	Маркер, инактивирующийся при введении вставки	Особые свойства ²⁾	Литература
pKT210	RSF1010	11,8	<i>Sst</i> I <i>Hind</i> III <i>Eco</i> RI, <i>Hpa</i> I	<i>Cm</i> <i>Cm</i> , <i>Sm</i> <i>Cm</i>	<i>Sm</i> — <i>Sm</i>	<i>Mob</i> ⁺	[9]
pKT230	RSF1010/pACYC177	11,9	<i>Sst</i> I, <i>Eco</i> RI <i>Hind</i> III, <i>Xho</i> I <i>Xma</i> I <i>Bst</i> EII, <i>Bam</i> HI	<i>Km</i> <i>Sm</i> <i>Km</i> , <i>Sm</i>	<i>Sm</i> <i>Km</i> —	<i>Mob</i> ⁺	[9]
pKT231	RSF1010	12,8	<i>Sst</i> I, <i>Eco</i> RI <i>Hind</i> III, <i>Xho</i> I, <i>Cla</i> I, <i>Xma</i> I	<i>Km</i> <i>Sm</i>	<i>Sm</i> <i>Km</i>	<i>Mob</i> ⁺	[9]
pKT212/214	RSF1010	15,7	<i>Bgl</i> II, <i>Xba</i> I <i>Bam</i> HI <i>Sst</i> I, <i>Eco</i> RI	<i>Sm</i> , <i>Cm</i> <i>Sm</i> , <i>Cm</i> , <i>Tc</i> <i>Cm</i> , <i>Tc</i>	<i>Tc</i> — <i>Sm</i>	<i>Mob</i> ⁺	[13]
pKT262	pKT230	11,7	Делеционный вариант pKT230			<i>Mob</i> ⁻	[9]
pKT263	pKT231	12,8	Делеционный вариант pKT231			<i>Mob</i> ⁻	[9]
pKT240	RSF1010	12,5	<i>Hind</i> III, <i>Xho</i> I, <i>Xma</i> I <i>Cla</i> I <i>Sst</i> I, <i>Eco</i> RI	<i>Ap</i> <i>Ap</i> , <i>Km</i>	<i>Km</i> —	Для поиска про- моторов	[32]
pMMB33/34	RSF1010	13,75	<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI <i>Sst</i> I	<i>Km</i>		Космида <i>Mob</i> ⁺	[30]
14* pMMB22	pKT240	12,7	<i>Eco</i> RI	<i>Ap</i>	—	Экспрессирующий вектор с <i>lac</i> -про- мотором ³⁾	[32]
pMMB24	pKT240	12,7	<i>Hind</i> III	<i>Ap</i>	—	Экспрессирующий вектор с <i>lac</i> -про- мотором ³⁾	[15]
pGV1106	Sa	8,4	<i>Eco</i> RI <i>Bam</i> HI, <i>Pst</i> I, <i>Bgl</i> II, <i>Sac</i> II	<i>Km</i> <i>Km</i> , <i>Sp</i>	<i>Sp</i> —		
pGV1122	Sa	10,8	<i>Hind</i> III, <i>Bam</i> HI, <i>Sal</i> I, <i>Pst</i> I	<i>Sp</i> <i>Sp</i> , <i>Tc</i>	<i>Tc</i> —	Аmplифицируется в присутствии <i>Cm</i> <i>Mob</i> ⁺	[15]
pSa4	Sa	9,4	<i>Kpn</i> I <i>Bam</i> HI, <i>Sst</i> I	<i>Sp</i> , <i>Cm</i> <i>Sp</i> , <i>Cm</i> <i>Km</i>	<i>Km</i> —		[14]
pRK290	RK2	20	<i>Eco</i> RI, <i>Bgl</i> II	<i>Tc</i>	—	Малокопийный <i>Mob</i> ⁺	[20]
pRK2501	RK2	11,1	<i>Xho</i> I, <i>Hind</i> III, <i>Sal</i> I, <i>Eco</i> RI, <i>Bgl</i> II	<i>Tc</i> . <i>Km</i> <i>Km</i> , <i>Tc</i>	<i>Km</i> <i>Tc</i> —	Малокопийный <i>Mob</i> ⁺	[20]
pRP301	RP4	54,7	<i>Bam</i> HI, <i>Eco</i> RI <i>Hind</i> III	<i>Ap</i> , <i>Tc</i>	—	Малокопийный <i>Tra</i> ⁺	[20]
pLAFRI	pRK290	21,6	<i>Eco</i> RI	<i>Tc</i>	—	Космида <i>Mob</i> ⁺	[28]
pME290	pVSI	6,8	<i>Hind</i> III, <i>Xho</i> I, <i>Xma</i> I <i>Pst</i> I	<i>Cb</i> <i>Km</i>	<i>Km</i> <i>Cb</i>	Не реплицируется в <i>E. coli</i>	[20]

1), 2) Сокращения указаны в примечании к табл. 1.

3) *lac*-Промотор образован в результате слияния области —35 *trp*-промотора *E. coli* и области —10 промотора *lacUV5 E. coli* [32].

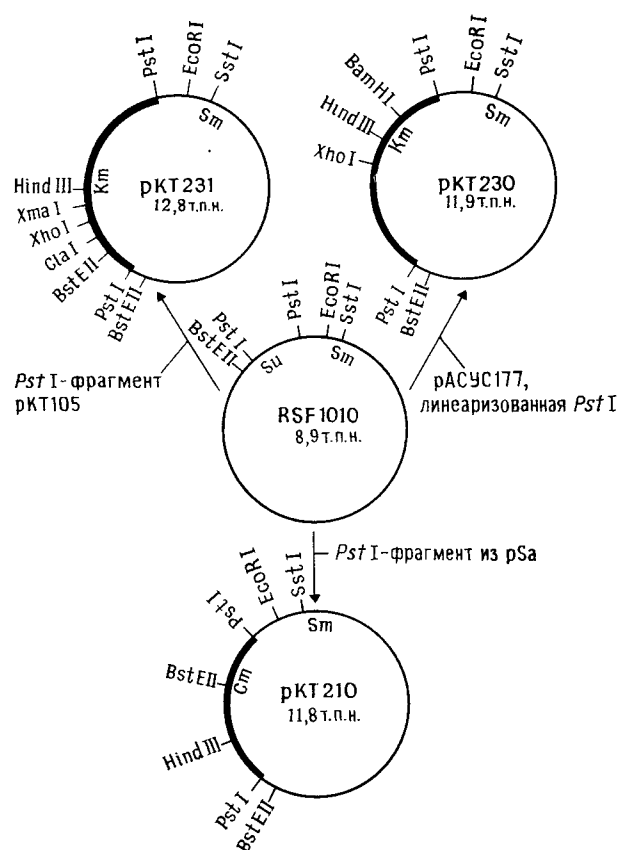


Рис. 2. Векторы с широким спектром хозяев, полученные на основе RSF1010.

Схема конструирования трех из них — pKT210, pKT231 и pKT230 — приведена на рис. 2. В табл. 2 перечислены свойства ряда векторов с широким спектром хозяев. Плазмида pKT210 сконструирована путем введения фрагмента ДНК плазмиды Sa длиной 3,6 т.п.н., кодирующего устойчивость к хлорамфениколу (Cm), в сайт *PstI* плазмиды RSF1010. Этот вектор можно использовать для клонирования в сайтах *SstI*, *EcoRI* и *HindIII*. Рекомбинантные молекулы, несущие вставки в *EcoRI*- и *SstI*-сайтах, обнаруживаются по потере устойчивости к *Sm*. Плазмиды pKT230 и pKT231 имеют сходную структуру; pKT230 представляет собой двойной репликон, полученный при лигировании линейаризованной *PstI* плазмиды pACYC177 [12] с расщепленной *PstI* RSF1010. Она кодирует устойчивость к *Sm* и канамицину (*Km*) и позволяет клонировать фрагменты, полученные

при помощи *HindIII*, *XhoI*, *XmaI*, *BstEII*, *BamHI*, *EcoRI* и *SstI*. Вектор pKT231 также кодирует устойчивость к *Sm* и *Km* (соответствующие гены локализованы в *PstI*-фрагменте длиной 4,6 т.п.н., полученном из R6-5 миниплазмиды pKT105 и введенном в RSF1010). В этой плазмиде можно клонировать фрагменты *EcoRI*, *SstI*, *HindIII*, *XhoI*, *XmaI*, *ClaI*. Число копий на эквивалент генома для всех векторов, полученных на основе репликона RSF1010, составляет 15—20.

Имеются векторы, полученные путем введения в репликон RSF1010 в качестве селективного маркера гена устойчивости к тетрациклину (*Tc*). Хотя плазмиды pKT212 и pKT214 включены в табл. 1, следует отметить, что они имеют ограниченное применение для *Pseudomonas* и, вероятно, для других грамотрицательных бактерий. Эти плазмиды нестабильны, особенно в бактериальных культурах, выращенных в отсутствие антибиотиков, видимо, вследствие того, что мембранный белок, обуславливающий устойчивость к тетрациклину, неблагоприятно влияет на жизнеспособность хозяина [13].

Следует отметить, что все векторы, полученные на основе RSF1010, заметно крупнее обычно используемых векторов *E. coli*. На начальном этапе разработки основанных на RSF1010 векторов было сделано немало попыток уменьшить размеры плазмидных репликонов [9, 10]. Все они закончились неудачей. Недавние исследования [10] показали, что причина этой неудачи заключена в сложности репликационного механизма плазмиды. Для репликации необходимы по крайней мере три гена, *repA*, *repB* и *repC*, расположенные в геноме плазмиды в нескольких т.п.н. от точки начала репликации (*Ori*, см. рис. 1). Таким образом, лишь небольшая часть генома плазмиды может быть удалена без нарушения репликации. В связи с этим получение векторов, сравнимых по размеру с плазмидами *E. coli*, — задача необычайно трудная.

Плазмидные векторы на основе RSF1010 сейчас используются при работе со многими грамотрицательными бактериями (табл. 3).

2.2. Векторы на основе Inc W-плазмиды

В лабораториях Кадо [14] и Шелл [15] были сконструированы многоцелевые векторы на основе плазмиды pSa. Плазмида pSa имеет молекулярную массу 29,6 т.п.н. и принадлежит к группе несовместимости W. Полученные на ее основе векторы представлены в табл. 2. Начальный этап конструирования векторов заключался в делеции из плазмиды генов конъюгативного переноса и получении «мини-Sa». В дальнейшем в нее были введены селективные маркеры и ряд пригодных для клонирования сайтов рестрикции. В отличие от RSF1010 выделение

Таблица 3. Спектр хозяев для векторов на основе RSF1010¹⁾

Escherichia coli
Pseudomonas aeruginosa
Pseudomonas putida
Agrobacterium tumefaciens
Azotobacter vinelandii
Alcaligenes eutrophus
Alcaligenes faecalis
Acetobacter xylinum
Methylophilus methylotrophus
Rhodopseudomonas spheroides
Rhizobium meliloti
Rhizobium leguminosarum
Caulobacter crescentus
Yersinia enterocolitica
Klebsiella aerogenes
Serratia marcescens
Erwinia carotovora
Xanthomonas compestris
Gluconobacter sp.

¹⁾ По данным работ [9] и [13].

плазмиды «мини-Sa» оказалось несложным. Кодированная устойчивость к *Km* и *Sp* плазмиды pGV1106 [15], например, была получена путем рециркуляризации *Bgl*II-фрагмента pSa длиной 8,4 т. п. н.

Векторы на основе pSa представляют собой полезное дополнение к векторам типа RSF1010. Более того, поскольку эти векторы принадлежат к различным группам несовместимости, они могут стабильно сосуществовать в одной бактериальной клетке. Это открывает возможности проведения генетического анализа, в частности исследования комплементации между клонированными последовательностями в большом наборе грамотрицательных бактерий.

3. Практическое применение векторов с широким спектром хозяев

В этом разделе приведены основные методы работы с векторами.

3.1. Выделение векторной ДНК

Большинство обычно используемых методов выделения дают удовлетворительные результаты, особенно если плазмиду размножают в *E. coli*. Если ДНК предназначена для клонирования, полезно очистить ее в градиенте плотности CsCl с этидиумбромидом. Воспроизводимо хороший выход дает метод «осветлен-

ного лизата», описанный в работе [16]. Тем не менее необходимо отметить два момента. Во-первых, за редким исключением, при добавлении к культуральной среде хлорамфеникола не наблюдается избыточной репликации плазмиды в сравнении с хромосомной ДНК. Во-вторых, клетки *Pseudomonas* лизируются быстрее, чем *E. coli*. Поэтому время инкубации после добавления детергентов (Brij 58 или Тритон X100) необходимо уменьшить до 1–2 мин. Если этого не сделать, то при центрифугировании «осветленного лизата» осадки будут неплотными и произойдет значительная потеря плазмидной ДНК. Кроме того, возникают трудности при отделении лизата от осадка разрушенных клеток.

Для проверки плазмидной ДНК, присутствующей в трансформантах, очень удобны аналитические методы выделения, особенно методы Холмса и Куигли [17] и Бирнбойма и Доли [18]. Здесь так же, как при работе с некоторыми грамотрицательными бактериями, могут возникать трудности при лизисе клеток. Тем не менее метод Бирнбойма и Доли дает хорошие результаты для большинства проверенных на сегодняшний день бактерий.

3.2. Клонирование фрагментов ДНК с использованием векторов с широким спектром хозяев

Методические приемы клонирования ДНК в плазмидных векторах описаны очень подробно (см., например, работу [19]) и вполне применимы при клонировании в плазмиды с широким спектром хозяев. Необходимо лишь иметь в виду, что эти векторы обычно больше по размеру, чем стандартные векторы для клонирования в *E. coli*. Вот почему для получения необходимых молярных концентраций «липких» или «тупых» концов при лигировании требуются большие концентрации лигированной векторной ДНК.

3.3. Трансформация грамотрицательных бактерий, не относящихся к энтеробактериям, ДНК векторов с широким спектром хозяев

Несмотря на то что для *E. coli* разработаны эффективные методы трансформации плазмидной ДНК (см., например, работу [9]), имеется лишь небольшое число примеров трансформации других грамотрицательных бактерий. Некоторые из них, например *P. stutzeri* и *Thiobacillus* sp., могут трансформироваться линейной двухцепочечной ДНК без предварительной химической обработки клеток [20]. Для эффективной трансформации *E. coli* плазмиды в качестве реципиента обычно используют дефектные по рестрикции (*hsdR*) штаммы. Для дру-

Таблица 4. Частота трансформации различных бактерий ДНК RSF1010

Бактерия-хозяин ¹⁾	Фенотип ²⁾	Частота трансформации (на 1 мкг ДНК RSF1010)
<i>E. coli</i> SK1592	<i>hsdR hsdM</i> ⁺	3,6·10 ⁶
<i>P. aeruginosa</i> PAO1162	<i>rmo mod</i> ⁺	6,7·10 ⁴
<i>P. putida met-2</i> KT2440	<i>rmo mod</i> ⁺	3·10 ³
<i>P. putida mt-2</i>	<i>rmo</i> ⁺ <i>mod</i> ⁺	3·10 ⁴

(повышается до 8·10³ при использовании ДНК, модифицированной в хозяине)

¹⁾ См. работу [9].

²⁾ *hsdR* — определяемая хозяином рестрикция; *hsdM*⁺ — определяемая хозяином модификация; *rmo* — определяемая хозяином рестрикция; *mod*⁺ — определяемая хозяином модификация.

гих грамотрицательных бактерий такие мутанты почти неизвестны, что делает крайне трудной или даже невозможной трансформацию этих бактерий чужеродной ДНК. Тем не менее у *P. putida* и *P. aeruginosa*, обладающих высокоэффективной системой рестрикции [9, 21], удалось получить штаммы (*rmo*) с пониженной способностью к рестрикции [9]. Таблица 4 показывает, с какой эффективностью эти мутанты *Pseudomonas* трансформируются плазмидной ДНК. Для сравнения приведена эффективность трансформации штамма *hsd* *E. coli* SK1592 и *P. putida mt-2 rmo*⁺. Эффективность трансформации *P. aeruginosa* PaO1162 *rmo* и *P. putida* 2440 *rmo* значительно ниже, чем *E. coli*. В случае *P. putida mt-2 rmo*⁺ эффективность трансформации гетерологичной ДНК еще ниже, однако при использовании модифицированной в хозяине плазмидной ДНК ее уровень повышается до уровня трансформации дефектных по рестрикции штаммов.

Трудности, связанные с низкой эффективностью трансформации, в большинстве случаев делают нереальными попытки прямой трансформации этих бактерий продуктами реакции лигирования. Наилучший подход состоит в использовании в качестве промежуточного хозяина для трансформации и скрининга рекомбинантных плазмид *E. coli*. После идентификации и очистки нужной рекомбинантной плазмиды ее используют для трансформации желаемого хозяина. Метод с использованием амплификации в *E. coli* позволяет значительно повысить вероятность успешной трансформации выбранного хозяина. Представленный ниже метод трансформации основан на методике Кашнера [22], модифицированной для обеспечения приемлемой эффективности трансформации бактерий типа *Pseudomonas* с использованием очищенной ДНК [9].

1. Инкубируйте бактерии в L-бульоне [23] до ОП₆₅₀ = 0,3—0,4.
2. Соберите клетки центрифугированием в течение 5 мин при 7000 об/мин и 0 °С. Удалите надосадок.

3. Осторожно суспендируйте клетки в том же объеме охлажденного во льду буфера для трансформации (10 mM MOPS pH 7,0; 10 mM RbCl, 100 mM MgCl₂) и отцентрифугируйте так же, как на стадии 2.

4. Осторожно ресуспендируйте клетки в таком же объеме охлажденного во льду буфера для трансформации и проинкубируйте 30 мин при 0 °С.

5. Соберите клетки центрифугированием, удалите надосадок и ресуспендируйте в 1/10 объема охлажденного во льду буфера для трансформации.

6. Разделите суспензию клеток на аликвоты по 0,2 мл и добавьте ДНК (до 1 мкг в максимальном объеме 25 мкл). Проинкубируйте 45 мин при 0 °С.

7. Подвергните клетки тепловому шоку 2 мин при 42 °С.

8. Добавьте к суспензии 2 мл L-бульона и проинкубируйте 90 мин при 30 °С.

9. Рассейте аликвоты объемом 0,1 мл на селективной среде.

Обратите внимание, что буфер для трансформации не содержит CaCl₂. Эта соль обычно применяется для трансформации *E. coli*. Мы также использовали ее для трансформации бактерий *Pseudomonas* sp. Однако CaCl₂, по-видимому, обуславливает гибель клеток *Pseudomonas*, понижая эффективность трансформации в ~10 раз (Багдасарьян и Франклин, неопубликованные данные).

3.4. Введение векторов с широким спектром хозяев в бактерии-реципиенты путем мобилизации

Трансформация многих видов грамотрицательных бактерий в настоящее время невозможна. Вероятно, в будущем, когда эти бактерии будут изучены более тщательно, такие способы появятся, однако сейчас методы рекомбинантных ДНК находят ограниченное применение для генетического анализа этих бактерий. К счастью, кроме трансформации существует и другой метод введения рекомбинантных плазмид в бактерии-реципиенты — мобилизация плазмид. Этот метод обладает преимуществами и для тех видов, которые способны трансформироваться, поскольку не предусматривает обязательной при трансформации *Pseudomonas* и родственных бактерий очистки ДНК. При введении большого числа рекомбинантов в бактерии-реципиенты очистка ДНК может стать проблемой, так как выделение плазмидной ДНК из нескольких сотен клонов занимает длительное время. Хотя можно выделить плазмидную ДНК сразу из нескольких клонов и трансформировать бактерии этим суммар-

Таблица 5. Некоторые плазмиды-«помощники» для мобилизации векторов

Плазмида	Репликон	Группа не-совмести-мости	Селективный маркер ¹⁾	Литература
pLG221	ColI-b drd-1	Iα	Km	[24]
pLG223	ColI-b drd-1	Iα	Tc	[24]
R64drd-11	R64	Iα	Sm	[9]
RK2/RPU	—	P-1	Tc, Ap, Km	[5]
pSa322	Sa/pBR322	W	Ap	[14]

¹⁾ Сокращения см. в примечании к табл. 1.

ным препаратом, метод мобилизации плазмид обычно быстрее и проще. Многие из описанных в этой главе плазмидных векторов, хотя сами по себе и нетрансмиссивны, могут передаваться многим реципиентам путем мобилизации. Это свойство определяется присутствием в векторном репликоне детерминант *mob*, *oriT* (участок начала переноса) и *nic* (одноцепочечный разрыв, вносимый релаксационным комплексом). Эти участки картированы в плазмидах RSF1010 и RK2 [5, 9]. Другой необходимый компонент системы — наличие в донорной клетке плазмиды-«помощника», несущей гены переноса (*tra*), необходимые для транспорта вектора в штамм-реципиент. Роль «помощника» с высокой эффективностью могут выполнять различные трансмиссивные плазмиды (см. табл. 5). RP4, например, мобилизует производные RSF1010, в частности pKT230, с частотой переноса $7,5 \cdot 10^{-1}$ на 1 донорную клетку [9]. Удивительна и практически полезна способность плазмид *incIα*, таких, как pLG221, стимулировать перенос векторов в большое число различных реципиентов [24] (Франклин и Боулнойс, неопубликованные данные). Спектр хозяев для плазмид *incIα* ограничен *E. coli* и близкородственными бактериями. Следовательно, при переносе векторных плазмид, например, в *Pseudomonas* сами они не смогут перейти в эти бактерии. Таким образом, перенос вектора или рекомбинантной плазмиды можно провести без мешающего переноса плазмиды-«помощника». Ниже описаны два сходных метода мобилизации. Первый из них удобен для переноса одного или немногих клонированных плазмид, а второй приспособлен для экспериментов, в которых требуется перенос большого числа плазмид, например для скрининга космидных библиотек.

3.4.1. Мобилизация одного или немногих клонов

1. Вырастите 5 мл культуры донорных (штамм, содержащий переносимую плазмиду и плазмиду-помощник) и реципиентных клеток на L-бульоне в течение ночи при 30 °C. Среда для выра-

щивания донорных бактерий должна содержать антибиотики, устойчивость к которым кодируется плазмидами.

2. Положите на чашку с L-агаром нитроцеллюлозный фильтр диаметром 10 мм (например, Millipore HAWPO 1300 с размером пор 0,45 мкм или эквивалентный другой фирмы).

3. Нанесите на фильтр по 10 мкл суспензии донорных и реципиентных бактерий. Проинкубируйте 6—15 ч при 30/37 °C.

4. Перенесите фильтр в пробирку, содержащую 1 мл 0,9% NaCl. Суспендируйте клетки на механическом встряхивателе.

5. Разведите суспензию клеток и расseyте на среде, необходимой для селекции несущего плазмиду штамма-реципиента.

3.4.2. Мобилизация большого числа клонов

1. Засейте индивидуальными колониями донорных бактерий микротитровальный планшет с 96 лунками, содержащими по 0,1 мл L-бульона с нужными антибиотиками. Проинкубируйте ночь при 37 °C.

2. Засейте 5 мл L-бульона реципиентными клетками и инкубируйте в течение ночи при 30/37 °C.

3. Нанесите 0,1 мл культуры реципиентных клеток на всю поверхность чашки с L-агаром. На один планшет донорных бактерий требуются две чашки.

4. Перенесите небольшие аликвоты (5—10 мкл) донорного штамма на поверхность засеянного реципиентными клетками агара. Удобнее всего использовать стерильную гребенку с 48 зубцами, расположенными в блоке 6×8 так, что их можно окунуть в половину лунок микротитровального планшета. Таким образом за один раз можно перенести 48 клонов. Проинкубируйте чашки 6—12 ч при 30/37 °C.

5. Приготовьте чашку-реплику [23] на среде, необходимой для селекции несущего плазмиду штамма-реципиента.

4. Векторы с широким спектром хозяев для специальных целей

Многие из имеющихся сегодня векторов *E. coli* обладают свойствами, необходимыми для каких-либо конкретных целей. Типичные примеры — это экспрессирующие векторы [19], плазмиды для клонирования таких последовательностей, как промоторы и терминаторы [25], векторы для прямого обнаружения или селекции рекомбинантов [26], малокопийные векторы и плазмиды (космиды), пригодные для клонирования больших фрагментов ДНК (нужных при конструировании геномных библиотек) [27]. Сейчас появляются подобные векторы с широким спектром хозяев. Пока, правда, они не настолько совершенны, как векторы для *E. coli*, однако обладают преимуществами при анализе генов из необычных бактерий.

4.1. Космиды с широким спектром хозяев

Метод упаковки ДНК в частицы фага λ *in vitro* позволяет использовать космиды (плазмиды, содержащие *cos*-сайт фага λ) для клонирования в *E. coli* фрагментов ДНК длиной 30—40 т.п.н. Потенциально данный метод весьма полезен для генетического анализа грамотрицательных бактерий. В настоящее время разработана двустадийная процедура, основанная на RSF1010-космиде, используемой в сочетании с мобилизацией, описанной в разд. 3.4.2.

Хотя сконструировано довольно много космид с широким спектром хозяев [28, 29], все они, за исключением рММВ33 и рММВ34 [30], имеют ограниченное применение. Некоторые из них нестабильны, другие не содержат уникальных сайтов для *Bam*HI или *Bgl*II, необходимых для клонирования фрагментов, получаемых при частичном расщеплении *Sau*3A или *Mbo*I. Кроме того, если сайт клонирования не дефосфорилирован, все они при лигировании образуют поликосмиды.

Космиды рММВ33 (рис. 3) и рММВ34 сконструированы на основе репликона RSF1010 и имеют длину 13,75 т.п.н. Они отличаются лишь ориентацией *Bst*EII/*Hpa*I фрагмента, содержащего ген устойчивости к *Km* и *cos*-сайт фага λ . Важным этапом при конструировании этих плазмид было превращение *Hpa*I-сайта плазмиды RSF1010 (расположенного между сайтами *Eco*RI и *Sst*I) при помощи синтетических линкеров в сайт для *Bam*HI. Эти векторы успешно использовались для конструирования геномных библиотек нескольких грамотрицательных бактерий, включая ряд видов *Pseudomonas* и *Thiobacillus* [30].

4.1.1. Клонирование в рММВ33 и рММВ34

Общая стратегия клонирования представлена на рис. 3.

1. Разделите 5 мкг векторной ДНК (количество при необходимости можно изменить) на 2 аликвоты. Обработайте одну *Hpa*I, а другую — *Sma*I.

2. Остановите реакцию прогревом при 70 °C в течение 10 мин.

3. Для проверки полноты расщепления проанализируйте с помощью электрофореза в агарозном геле небольшую часть обеих реакционных смесей.

4. Полностью расщепите оба препарата *Bam*HI.

5. Частично расщепите высокомолекулярную (~100 т.п.н.) геномную ДНК *Sau*3A при таких условиях, чтобы основная масса полученных фрагментов имела длину 30—40 т.п.н. После этого фрагменты хромосомной ДНК можно фракционировать по размеру в градиенте концентраций NaCl или сахарозы. Для конструирования геномных библиотек бактерий, однако, в этом

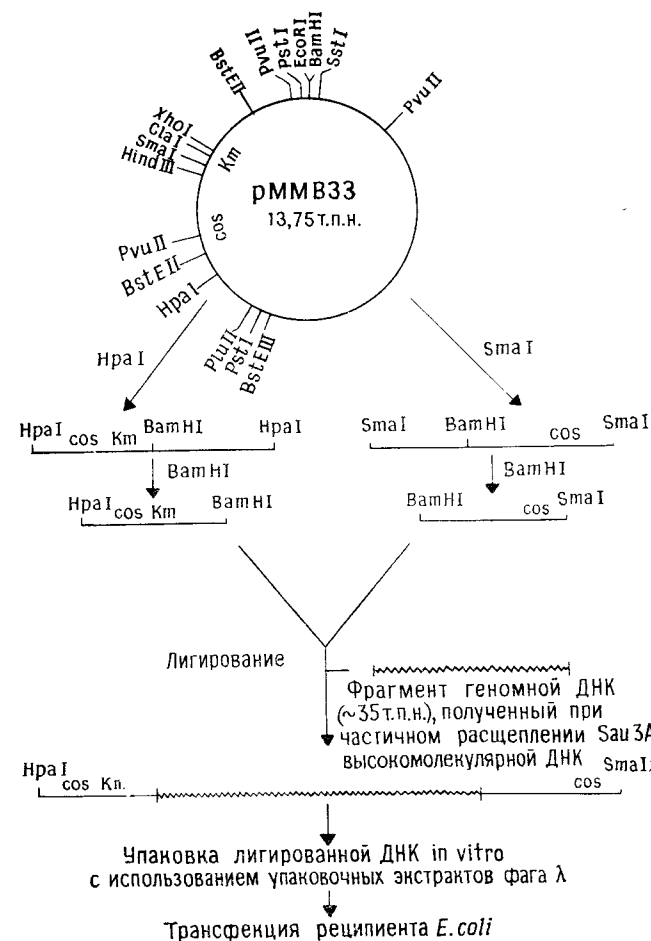


Рис. 3. Космида рММВ33 и общая схема клонирования в космидах.

обычно нет необходимости, так как размер их геномов невелик и необходимое число рекомбинантов (~500) можно получить и без селекции по размерам.

6. Лигируйте 1 мкг ДНК «плеч» вектора с 5 мкг расщепленной *Sau*3A хромосомной ДНК в 25 мкл буфера для лигирования, содержащего 5 mM $MgCl_2$ и 5 mM АТФ [30].

7. Упакуйте аликвоты лигированной ДНК объемом 5 мкл, используя упаковочные экстракты фага λ , как описано Маниатисом с соавт. [19].

8. Выращите *E. coli* DH1 [19] или CF503 [30] в L-бульоне с 0,4% мальтозы до поздней экспоненциальной фазы. Смешай-

те 500 мкл этой культуры с 250 мкл упакованной *in vitro* космиды и проинкубируйте 1 ч при 37 °С.

9. Рассейте бактерии для селекции на L-агаре, содержащем 50 мкг/мл канамицина.

10. Для сохранения клонов перенесите колонии по одной в лунки микротитровальных планшетов, содержащие по 200 мкл среды для замораживания Хогнесса [L-бульон с добавлением 8,8% глицерина, 3 мМ ацетата натрия; 55 мМ K_2HPO_4 ; 26 мМ KH_2PO_4 ; 1 мМ $MgSO_4$; 15 мМ $(NH_4)_2SO_4$]. Проинкубируйте 6 ч при 37 °С и храните при -70 °С.

Если скрининг клонов необходимо провести не в *E. coli*, а в другом генетически отличающемся организме, полезно трансформировать космидами штамм *E. coli*, содержащий подходящую плазмиду-помощник (например, CF503). После этого библиотеку можно быстро перенести в нужную бактерию-реципиент, как описано в разд. 3.4.2.

4.2. Регулируемые экспрессирующие векторы с широким спектром хозяев

После того как нужный ген клонирован, необходимо оптимизировать его экспрессию и добиться максимального выхода продукта, для того чтобы иметь этот продукт в количествах, достаточных и для исследований, и для коммерческого использования. Существует множество экспрессирующих векторов, созданных на основе плазмид *E. coli*. В них включены хорошо изученные сильные промоторы, такие, как *lac UV5*, *trp* или λP_L [19]. Важное достоинство этих промоторов в том, что их транскрипционная активность может регулироваться специфическими репрессорами. Возможность «выключения» экспрессии позволяет избежать ряда нежелательных эффектов, так как присутствие в больших количествах продукта чужеродного гена в течение всей фазы роста может угнетать размножение клеток.

На основе плазмиды с широким спектром хозяев RSF1010 недавно сконструированы два экспрессирующих вектора (рис. 4). Плазмиды pMMB22 и pMMB24 содержат промотор *tac*, полученный путем слияния области -35 промотора *trp* *E. coli* и области -10 промотора *lac UV5* [31, 32]. Этот промотор регулируется *lac*-репрессором. В ходе конструирования плазмид в них был включен фрагмент, кодирующий ген *lacI^Q*, что дает возможность регулирования транскрипционной активности *tac*-промотора pMMB22 и pMMB24. В плазмиде pMMB22 *tac*-промотор находится между *EcoRI* и *HindIII*-сайтами pKT240 [32] так, что транскрипция проходит через *EcoRI*-сайт. В pMMB24 *tac*-промотор расположен в обратной ориентации таким образом, что с него транскрибируется фрагмент ДНК, клонированный в *HindIII*-сайте.

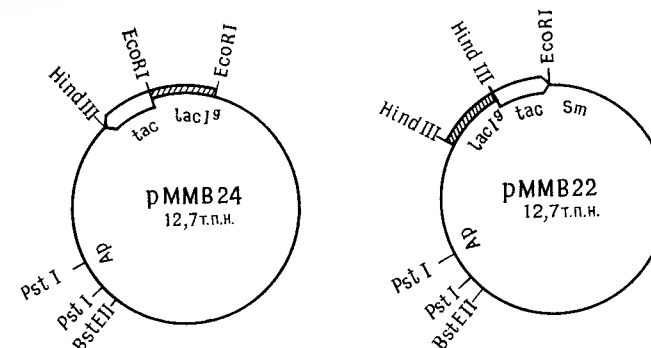


Рис. 4. Экспрессирующие векторы с *tac*-промотором pMMB22 и pMMB24.

Главный вопрос при конструировании экспрессирующих векторов состоял в том, будет ли *tac*-промотор работать и регулироваться в организмах, генетически отличающихся от *E. coli*. Известно, что гены из грамотрицательных организмов, не относящихся к энтеробактериям, плохо экспрессируются в *E. coli*, однако обратная ситуация была изучена недостаточно. Недавно удалось показать, что *trp*-оперон *E. coli* эффективно экспрессируется в *P. aeruginosa* [33]. Из этого следовало, что барьера при переносе генов в этом направлении не существует. Чтобы изучить этот вопрос для генов, транскрибирующихся с *tac*-промотора экспрессирующих векторов, фрагмент ДНК, кодирующий фермент катехол-2,3-оксигеназу (K230) [4], был клони-

Таблица 6. Уровни экспрессии катехол-2,3-оксигеназы с использованием полученного на основе RSF1010 экспрессирующего вектора pMMB22

Плазмида ¹⁾	Хозяин ²⁾	Промотор ³⁾	Индуктор ⁴⁾	Активность K230 (мЕд/мин/мкг белка)
pWVO-161	P	<i>meta</i>	—	170
pWVO-161	P	<i>meta</i>	m-MBA	3040
pWVO-161	E	<i>meta</i>	—	50
pWVO-161	E	<i>meta</i>	m-MBA	240
pMMB25	E	<i>tac</i>	—	1040
pMMB25	E	<i>tac</i>	IPTG	20 350
pMMB25	P	<i>tac</i>	—	500
pMMB25	P	<i>tac</i>	IPTG	20 500

¹⁾ pWVO-161 — производное TOL-плазмиды pWVO со вставкой Tu401 (см. работу [4]); pMMB25 — pMMB22, несущая ген K230 pWVO в *EcoRI*-сайте вектора.

²⁾ P — *P. putida* mt-2 KT2440; E — *E. coli* SK1592.

³⁾ *meta* — промотор мета-пути pWVO, *tac* — см. примечание 3 к табл. 9.2.

⁴⁾ m-MBA — мета-метилбензиловый спирт. IPTG — изопропилтиогалактозид, 2 мМ для *E. coli*, 5 мМ для *P. putida*.

рован в *EcoRI*-сайте рММВ22. Полученная плазмида была обозначена рММВ25 [32]. Вставка кодировала структурный ген K230 и последовательность Шайна — Далгарно [34], но не содержала промотора. Уровень экспрессии K230 определяли по активности фермента в клеточных экстрактах из *E. coli* и *P. putida*. Результаты приведены в табл. 6. Из представленных данных следует, что уровни активности K230 в *E. coli* и *P. putida* близки. Более того, в обоих случаях экспрессия выключается *lac*-репрессором и индуцируется в присутствии IPTG. Этот факт демонстрирует принципиальную возможность получения эффективной регулируемой экспрессии генов грамотрицательных бактерий при помощи рММВ24 и рММВ22.

На практике при работе с этими плазмидами в *E. coli* и *P. putida* наблюдается лишь одно существенное различие. Для получения максимальной индукции в *P. putida* требуется несколько большая концентрация IPTG (5 мМ), чем в *E. coli* (2 мМ). При работе с другими организмами эта цифра, вероятно, может измениться, и концентрацию IPTG придется подбирать экспериментально.

4.3. Малокопийные векторы с широким спектром хозяев

Для клонирования некоторых генов, например кодирующих мембранные белки, необходимо применять малокопийные векторы, поскольку высокий уровень экспрессии таких генов может быть вредным или даже летальным для клетки. Имеется несколько типов таких векторов (табл. 2). Плазмиды рРК290, рРР301 и рРК2501 получены на основе, по-видимому, идентичных IncP-I конъюгативных плазмид RK2 и RP4. Число копий таких векторов составляет 2—8 на хромосому [13]. Для них характерен такой же широкий спектр хозяев, что и для родительских плазмид. Относительно стабильности этих плазмид в клетках микроорганизмов, отличных от *E. coli*, количественных данных нет [13].

Ряд векторов (например, рМЕ290) сконструирован на основе плазмиды рVSI *P. aeruginosa* [35]. Эти плазмиды обладают небольшим числом копий (около 8) [20] и в случае рМЕ290 невелики по размеру (6,8 т.п.н.) в сравнении с другими подобными векторами. Еще одно интересное свойство, которое необходимо учитывать при работе с рVSI и ее производными, состоит в том, что эти векторы, реплицируясь в *Pseudomonas* sp. и родственных бактериях, не реплицируются в *E. coli* [20].

4.4. Вектор для поиска промоторов на основе RSF1010

Конструирование плазмид, которые можно использовать для идентификации сигнальных последовательностей ДНК, таких, как промоторы и терминаторы, имеет немалое значение для

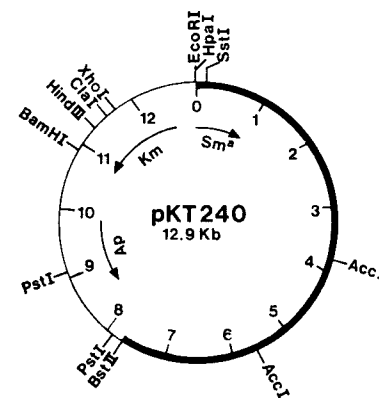


Рис. 5. Вектор для поиска промоторов рКТ240. Устойчивость к стрептомицину зависит от наличия промоторных последовательностей во фрагментах ДНК, вводимых в *EcoRI*-сайт.

анализа регуляции генов прокариот [25, 26]. Векторы, предназначенные для идентификации промоторов *E. coli*, основаны на хорошо охарактеризованных генах, продукты которых можно легко обнаружить и оценить их количество, например гене галактокиназы [25] и галактозидазы [36]. Если содержащий промотор фрагмент ДНК клонирован перед началом от этого гена, в клетке появится продукт его экспрессии.

Недавно описан вектор с широким спектром хозяев, пригодный для идентификации промоторов этим способом [32]. Плазмида рКТ240 (рис. 5) была сконструирована путем замены 1,3 т.п.н. фрагмента *BstEII/EcoRI* плазмиды RSF1010 на *BstEII/EcoRI*-фрагмент рHSG 415 длиной 3,9 т.п.н. [37]. Этот фрагмент кодирует устойчивость к *Ap* и *Km*. В результате замены из последовательности RSF1010 делетируются промотор гена устойчивости к *Su/Sm* и кодирующая последовательность гена устойчивости к *Sm*. Включение фрагментов ДНК, кодирующих промоторные последовательности, в *EcoRI*-сайт рКТ240 восстанавливает устойчивость к *Sm* ([32] и Франклин, неопубликованные данные), что позволяет легко обнаружить активность промотора по фенотипу.

Плазмиду можно использовать для скрининга фрагментов, кодирующих предполагаемые промоторы, либо для поиска промоторов в тотальной ДНК.

1. Полностью расщепите ДНК рКТ240 *EcoRI* в 50 мкл 50 мМ трис-НСl pH 7,5; 10 мМ $MgCl_2$, 100 мМ NaCl.
2. Инактивируйте рестриктазу 5 мин при 70°C. Осадите ДНК, добавив 3 М ацетат натрия до конечной концентрации 0,3 М и один объем изопропанола, охлажденного до -20°C.

Выдержите 20 мин при -70°C . Соберите выпавшую в осадок ДНК в микроцентрифуге. Осторожно удалите надосадок, промойте осадок ДНК 70%-ным этанолом и высушите в вакуумном эксикаторе.

3. Растворите осадок ДНК в 50 мкл буфера для фосфатазы (50 мМ трис-НСl pH 9,0; 1 мМ MgCl_2 , 100 мкМ ZnCl_2 ; 1 мМ спермидина). Проинкубируйте 30 мин при 37°C с двумя единицами фосфатазы из кишечника телят. Это необходимо для удаления 5'-фосфатных групп и предотвращения циклизации вектора при лигировании [19]. Остановите реакцию двухкратной экстракцией равным объемом фенола. Для удаления остатков фенола водную фазу проэкстрагируйте 5 раз эфиром. Осадите ДНК так же, как на стадии 2, и растворите в 20 мкл буфера для лигирования (50 мМ трис-НСl pH 7,5; 10 мМ MgCl_2 , 2 мМ АТР; 5 мМ ДТТ).

4. Расщепите 5 мкг предназначенной для скрининга ДНК *EcoRI*, как описано на стадии 1. Обработайте далее согласно процедурам стадий 2 и 3. Остановите реакцию, осадите ДНК и растворите ее в 80 мкл буфера для лигирования. Смешайте с векторной ДНК, добавьте 0,25 ед ДНК-лигазы фага T4 и проинкубируйте ночь при 15°C .

5. Лигированной ДНК трансформируйте *E. coli* по методике, описанной в гл. 6. На данном этапе можно выбрать один из вариантов — либо трансформировать *E. coli* для скрининга промоторной активности в этом хозяине, либо (имея в виду нередко плохую экспрессию в *E. coli* генов неродственных бактерий) выбрать штамм, несущий соответствующую плазмиду-помощник (описано в разд. 3.4.1). В дальнейшем это позволит провести скрининг в естественном хозяине гена.

6. В первом случае рассейте трансформированные клетки на чашках с L-агаром, содержащим *Sm* в диапазоне концентраций 20—200 мкг/мл. Во втором случае необходимо перенести рекомбинантные плазмиды в хозяина, из которого взяты предполагаемые промоторные последовательности. Если необходимо проверить какой-либо определенный фрагмент, мобилизацию можно провести после того, как будет идентифицирован соответствующий рекомбинантный клон. Если осуществляют поиск в тотальной ДНК, мобилизацию можно провести перед расщеплением ДНК, мобилизацию можно провести перед расщеплением ДНК, мобилизацию можно провести перед расщеплением ДНК. Выдержав клетки некоторое время (60—90 мин) для экспрессии, смешайте 1 мл суспензии трансформированных клеток с 0,2 мл культуры бактерий-реципиентов, находящейся на поздней логарифмической стадии роста. Нанесите аликвоты по 25 мкл на фильтры и продолжайте далее так, как описано в разд. 3.4. Затем рассейте клетки на L-агаре, содержащем 20—200 мкг/мл стрептомицина и антибиотик, нужный для подавления роста донора. Проинкубируйте в течение ночи.

7. При отсутствии вставки, несущей промотор, вектор pKT240 придает хозяину устойчивость к 20 мкг/мл стрептомицина (для *E. coli*) и к 50 мкг/мл (для *P. putida*). Отберите колонии, растущие при более высоких концентрациях стрептомицина, и рассейте их заново для очистки и проверки на устойчивость.

8. Выделите ДНК и охарактеризуйте фрагмент-вставку. Правильно оценить активность промотора можно, определив активность стрептомицинофосфотрансферазы [32].

4.5. Векторы на основе RSF1010, удовлетворяющие требованиям биологической безопасности

Некоторые эксперименты по клонированию попадают под действие правил, регламентирующих работы с рекомбинантными ДНК, и должны выполняться только с использованием определенных систем вектор-хозяин. Одно из основных правил состоит в том, что применяемый вектор должен быть нетрансмиссибельным и не должен переноситься совместно с конъюгативной плазмидой путем мобилизации. На основе RSF1010 сконструировано несколько отвечающих этим требованиям плазмид [9]. Для этого была выделена производная от RSF1010 плазида, содержащая в локусе *mob* элемент *Tn3*. Затем эта плазида была линейаризована *BamHI* (*BamHI*-сайт расположен в элементе *Tn3*). После обработки нуклеазой *Bal31* из нее была получена плазида pKT261. Из этой плазмиды область *mob* и элемент *Tn3* были полностью удалены. В дальнейшем были сконструированы аналогичные pKT230 и pKT231 дефектные по мобилизации векторы, обозначенные pKT262 и pKT263 (табл. 2). Табл. 7 иллюстрирует влияние делеции части репликона RSF1010 на способность RP4 мобилизовать эти

Таблица 7. Мобилизация с помощью RP4 *Mob*-векторов на основе RSF1010

Плазида	Плазида-помощник	Частота переноса на 1 донорную клетку ¹⁾
pKT230	—	$<4,8 \cdot 10^{-7}$
pKT230	RP4	$7,5 \cdot 10^4$
pKT231	—	$<1,7 \cdot 10^{-7}$
pKT231	RP4	$2,0 \cdot 10^4$
pKT262	RP4	$7,2 \cdot 10^{-8}$
pKT263	RP4	$3,7 \cdot 10^{-6}$

¹⁾ В качестве реципиента использовали клетки *P. putida* KT2440 rif^r (устойчивые к рифампицину).

плазмиды. В обоих случаях частота мобилизации уменьшилась на 5—6 порядков.

Эти плазмиды, используемые вместе с хозяевами *P. putida* 2440 и *P. aeruginosa* PA01162 [9], представляют собой систему вектор-хозяин, удовлетворяющую требованиям, предъявляемым к системе HV1 консультативным комитетом по рекомбинантным ДНК США и Западногерманской центральной комиссией по биологической безопасности.

Благодарности

Мне хотелось бы поблагодарить профессора М. Багдасарьяна за его поддержку при написании этой главы, Элизабет Баджер за перепечатку рукописи, Сузан Хейли за подготовку рисунков и Брина Прайса за изготовление фотографий.

Литература

1. Dalton H., Mortensen L. Bacteriol. Rev., **36**, 231 (1972).
2. Lundgren D. G., Silver M. Annu. Rev. Microbiol., **34**, 263 (1980).
3. Hütter R., Nuesch J., Leisinger T. (eds.). Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds, published by Academic Press, London, 1981.
4. Franklin F. C. H., Bagdasarian M., Bagdasarian M. M., Timmis K. N. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 7458 (1981).
5. Thomas C. M. Plasmid, **5**, 10 (1981).
6. Don R. H., Pemberton J. M. J. Bacteriol., **145**, 681 (1981).
7. Guerry P., Embden J., Falkow S. J. Bacteriol., **117**, 619 (1974).
8. Watanabe T., Furuse C., Sakaizum S. J. Bacteriol., **96**, 1791 (1968).
9. Bagdasarian M., Lurz R., Rückert B., Franklin F. C. H., Bagdasarian M. M., Frey J., Timmis K. N. Gene, **16**, 237 (1981).
10. Scherzinger E., Bagdasarian M. M., Scholz P., Lurz R., Rückert B., Bagdasarian M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **81**, 654 (1984).
11. Rubens C., Heffron F., Falkow S. J. Bacteriol., **128**, 425 (1976).
12. Chang A. C. Y., Cohen S. N. J. Bacteriol., **134**, 24 (1978).
13. Bagdasarian M., Timmis K. N. Curr. Topics Microbiol. Immunol., **96**, 47 (1982).
14. Tait R. C., Close T. J., Lundquist R. C., Hagiya M., Rodriguez L., Kado C. I. Biotechnology, **1**, 215 (1983).
15. Leemans J., Langenakens J., DeGreve H., Deblaere R., Van Montagu M., Schell J. Gene, **19**, 361 (1982).
16. Clewell D. B., Helinski D. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **62**, 1159 (1969).
17. Holmes D. S., Quigley M. Anal. Biochem., **114**, 193 (1981).
18. Birnboim H. C., Doly J. Nucleic Acids Res., **7**, 1513 (1979).
19. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1982.
20. Haas D., Experientia, **39**, 1199 (1983).
21. Holloway B. W. Virology, **25**, 634 (1965).
22. Kushner S. R. In: Genetic Engineering, Boyer H. W. and Nicosia S. (eds.), Elsevier/North Holland, Amsterdam, p. 17, 1978.
23. Miller J. H. Experiments in Molecular Biology, published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1972.
24. Boulnois G. J. Mol. Gen. Genet., **182**, 152 (1981).

25. McKenny K., Shimatke H., Court D., Schmeissner U., Brady C., Rosenberg M. In: Gene Amplification and Analysis, Chirikjian J. C., Papas T. S. (eds.), Elsevier/North Holland, Amsterdam, Vol. II, p. 383 (1981).
26. Vieira J., Messing J. Gene, **19**, 259 (1982).
27. Ish-Horowicz D., Burke J. F. Nucleic Acids Res., **9**, 2989 (1981).
28. Friedman A. M., Long S. R., Brown S. E., Buikema W. J., Ausubel F. M. Gene, **18**, 289 (1982).
29. Knauf V. C., Nester E. W., Plasmid, **8**, 45 (1982).
30. Frey J., Bagdasarian M., Feiss D., Franklin N. C. H., Deshusses J. Gene, **24**, 299 (1983).
31. deBoer H. A., Comstock L. J., Vasser M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **80**, 21 (1983).
32. Bagdasarian M. M., Amann E., Lurz R., Rückert B., Bagdasarian M. Gene, **26**, 273 (1984).
33. Sakaguchi K. Curr. Topics Microbiol. Immunol., **96**, 31 (1982).
34. Nakai C., Kagamiyama H., Nozaki M., Nakazawa T., Inouye S., Ebina Y., Nakazawa A. J. Biol. Chem., **258**, 2923 (1983).
35. Stanisich V. A., Bennett P. M., Richmond M. H. J. Bacteriol., **129**, 1227 (1977).
36. Casadaban M. J., Chou J., Cohen S. N. J. Bacteriol., **143**, 971 (1980).
37. Hashimoto-Gotoh T., Franklin F. C. H., Nordheim A., Timmis K. N. Gene, **16**, 227 (1981).

МЕТОДЫ КЛОНИРОВАНИЯ В БАЦИЛЛАХ

Кимбер Г. Харди

1. Введение

Потенциальные преимущества представителей рода *Bacillus* в роли бактериальных хозяев клонированной ДНК заключаются в их способности секретировать белки и в большом разнообразии штаммов, пригодных для лабораторного использования. Секретируемый белок обычно гораздо легче выделить и очистить, чем внутриклеточный. Кроме того, секретируемый белок — это почти всегда интактный белок, имеющий уже сформировавшуюся третичную структуру, в то время как для внутриклеточного продукта стадия окончательного формирования пространственной укладки молекулы неизбежно составляет часть процедуры выделения. Разные виды бацилл заметно различаются между собой по таким параметрам, как температурный оптимум (известно, например, много термофильных штаммов), протеолитическая активность и потребность в кислороде (среди этих организмов есть как облигатные аэробы, так и факультативные анаэробы).

Преимущества бацилл стали очевидны после 1978 г., когда появились первые сообщения об экспериментах по молекулярному клонированию в этих микроорганизмах [1—3]. Несколько плазмид опробовали в качестве векторов; были предприняты попытки с помощью различных промоторов экспрессировать в бациллярных системах ряд генов млекопитающих и вирусов; продукты некоторых чужеродных генов удалось получить в виде секретируемых молекул [4, 5]. Не следует, однако, думать, что все эксперименты по молекулярному клонированию в бациллах нацелены на экспрессию животных или вирусных генов; подобные опыты могут дать нам множество полезной информации и о самой бактерии, в частности о механизмах споруляции [6].

Эта глава написана для тех, кто уже знаком с основными приемами клонирования в *Escherichia coli* и желает работать с системами на основе *Bacillus*. Главные трудности, связанные

с использованием в качестве бактерии-хозяина представителей бацилл, заключаются, во-первых, в нестабильности плазмид (возможны как полная утрата плазмиды, так и разнообразные генетические перестройки) и, во-вторых, в высокой протеазной активности, свойственной некоторым штаммам. Кроме того, плазмидные векторы для *Bacillus* разработаны далеко не так полно как для *E. coli*. В частности, такие сильные контролируемые промоторы, как *trp*, *tac* и λ pL, получившие широкое распространение для экспрессии чужеродных генов в *E. coli*, не имеют пока столь же удачных аналогов, пригодных для использования в клетках бацилл. Проблемы, связанные с нестабильностью плазмид, могут быть обусловлены гомологичной рекомбинацией [7]. В некоторых случаях их удается обойти, если избежать присутствия в рекомбинантных конструкциях дуплицированных последовательностей. Деградацию продуктов клонированных генов логично предотвращать, используя виды с низкой протеолитической активностью, например *B. sphaericus*.

2. Штаммы и плазмиды

2.1. Бактериальные штаммы

Штаммы *B. subtilis*, обычно используемые в качестве хозяев для рекомбинантных плазмид, приведены в табл. 1. Пожалуй, наибольшее распространение получил штамм BR151. Почти все стандартные лабораторные штаммы *B. subtilis* 168 содержат в геноме два профага — PBSX и SP β (8). При индукции PBSX функциональные фаговые частицы не образуются: формирующиеся фаги содержат только бактериальную ДНК [9]. SP β способен к образованию функциональных частиц, но этот профаг довольно трудно индуцировать. Получены также штаммы, не содержащие в геноме указанных профагов (например, YB886, производный BR151, см. табл. 1).

Многие мутации, вызывающие нарушения споруляции (и в некоторых случаях соответствующее угнетение протеолитической активности), обуславливают также стойкую невосприимчивость клеток по отношению к чужеродной ДНК. Однако несмотря на то, что клетки таких штаммов не способны трансформироваться, полученные из них протопласты оказываются компетентными для трансформации. Были получены мутанты «высокопротеолитической» бактерии *B. subtilis*, не производящие некоторых протеаз, однако все они по общему уровню протеолитических ферментов оставляют далеко позади такие виды, как *B. sphaericus*, *B. freundenreichii* и *B. coagulans*. Для осуществления трансформации бактерий рода *Bacillus*, отличных от *B. subtilis*, следует работать со сферопластами.

Таблица 1. Штаммы *B. subtilis*, используемые в экспериментах по молекулярному клонированию

Штамм	Характеристика	Ссылка
BR151	<i>trpC2, metB10, lys-3</i>	[15]
YB886	<i>trpC2, metB10, xin-1, SPβ-</i>	[16]
MI112	<i>leuA8, arg-15, thr-5, recE4, r-, m-</i>	[12]
MI119	<i>leuB6, trpC2, r-, m-</i>	[12]
MI120	<i>leuB6, recE4, r-, m-</i>	[12]
CU403	<i>thyA, thyB, metB, divIVB1</i>	[17]
BD170	<i>trpC2, thr-5</i>	[9]
BD224	<i>trpC2, thr-5, recE4</i>	[9]

Аллель *recE4* [10] сильно подавляет, хотя и не исключает полностью гомологическую рекомбинацию; плазмиды, несущие последовательности, гомологичные участкам хромосомной ДНК, могут оказаться нестабильными даже в *recE4*-штаммах [11]. Как *RecE4+*-, так и *RecE-*штаммы одинаково хорошо трансформируются плазмидной ДНК [2].

Система рестрикции штамма *B. subtilis* 168 и его производных обнаруживает относительно низкую активность в отношении немодифицированной плазмидной ДНК. Хотя эффективность трансформации немодифицированной ДНК часто не отличается от эффективности трансформации модифицированной формой, описаны случаи, когда немодифицированная плазмидная ДНК трансформировала *r+*-штаммы с частотой, составляющей 10 или 0,2% от частоты трансформации *r-*-штамма [11—13]. Тем не менее на практике многие эксперименты по молекулярному клонированию успешно проводятся именно на *r+*-штаммах *B. subtilis*. Система рестрикции этой бациллы активна также по отношению к фаговой ДНК, проникающей в клетку путем трансфекции, но не реагирует на хромосомную ДНК, введенную при трансформации [14].

Музей бациллярных культур при Университете штата Огайо (The Bacillus Genetic Stock Centre, The Ohio State University) организует помощь и консультации по вопросам, связанным с поддержанием штаммов и плазмид, и, кроме того, выпускает весьма полезный каталог бациллярных штаммов, плазмид и фагов. Еще одним ценным источником информации может служить монография Гордона и соавт. [15], в которой большое число видов, отличных от *B. subtilis*, приводится с их регистрационными номерами по каталогу Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection).

2.2. Плазмиды

Наиболее распространенные плазмиды и векторы представлены в табл. 2—4. Многие векторы — это производные плазмид, изначально обнаруженных у *Staphylococcus aureus*, которые, как казалось, обладают способностью реплицироваться в клетках бацилл [12]. Некоторые из них родственны собственным плаздам *Bacillus* [19]; так, *pUB110* и *pBC16* обнаруживают целый ряд областей взаимной гомологии [19]. Плазмида *pBC16* — типичный представитель плазмид *Bacillus*; практически она идентична плазмиде *pAB124* [19]. Поскольку многие плазмиды грамположительных бактерий содержат протяженные участки гомологии, при конструировании векторов для клонирования следует следить за тем, чтобы гомологичные участки в них не повторялись. Надо сказать, что некоторые из плазмид, указанных в табл. 3, имеют две или более точек начала репликации, унаследованных от родительских форм. Это может служить причиной их относительной нестабильности. Полная нук-

Таблица 2. Плазмиды для клонирования в *Bacillus*

Плазмида	Источник	Мол. масса (×10 ⁻⁶)	Маркеры ¹⁾	Ссылка
pBC16	<i>Bacillus cereus</i>	3,0	Tc	[34]
pAB124	<i>B. stearothermophilus</i>	2,9	Tc	[35]
pPL10	<i>B. pumilus</i>	4,4	Бактериоцин	[36]
pPL7065	<i>B. pumilus</i>	4,6	Бактериоцин	[37]
pIM13	<i>B. subtilis</i>	1,5	Em	[38]
PLS28	<i>B. subtilis (natto)</i>	4,1	—	[40]
pBS1	<i>B. subtilis</i>	5,5	—	[34]
pFTB14	<i>B. amyloliquefaciens</i>	5,3	—	[40]
pUB110	<i>Staphylococcus aureus</i>	3,0	Km(Nm)	[41]
pE194	<i>S. aureus</i>	2,4	Em	[20, 41]
pC194	<i>S. aureus</i>	1,8	Cm	[12, 21, 42]
pT127	<i>S. aureus</i>	2,9	Tc	[12]
pC221	<i>S. aureus</i>	3,0	Cm	[12]
pC223	<i>S. aureus</i>	3,0	Cm	[12]
pUB112	<i>S. aureus</i>	3,0	Cm	[12]
pSA501				
(pS194)	<i>S. aureus</i>	2,8	Sm	[41—43]
pSA2100				
(pSC194)	<i>S. aureus</i>	4,7	Cm, Sm	[41—43]

¹⁾ Маркеры устойчивости: Tc, к тетрациклину; Cm, к стрептомицину; Km, к канамицину; Tr, к триметоприму; Ap, к ампициллину; Em, к эритромицину. Маркеры аутоотрофности: trp, биосинтез триптофана; leu, биосинтез лейцина; ilv, биосинтез изолейцина — валина.

Таблица 3. Рекомбинантные плазмиды, используемые для клонирования в *Bacillus*

Плазмида	Мол. масса ($\times 10^{-6}$)	Родительские плазмиды	Маркеры ¹⁾	Ссылка
pBD6	5,8	pSA501, pUB110	Sm, Km	[2, 44]
pBD8	6,0	pSA2100, pUB110	Sm, Cm, Km	[2, 44]
pBD9	5,4	pE194, pUB110	Em, Km	[2, 44]
pBD64	3,2	pC194, pUB110	Cm, Km	[44]
pHV11	3,3	pC194, pT127	Cm, Tc	[3]
pHV41	4,5	pC194, pUB110, pBR322	Cm, Km	[45]
pLS103	5,0	pUB110, ген <i>trp</i> <i>B. pumilus</i>	Km, <i>trp</i>	[1]
pLS105	5,4	pUB110, ген <i>trp</i> <i>B. licheniformis</i>	Km, <i>trp</i>	[46]
pTL10	9,4	pLS28, гены <i>leu</i> и <i>Trp</i> <i>B. subtilis</i>	<i>leu</i> , <i>Trp</i>	[47]
pTL12	6,4	pLS28, гены <i>leu</i> и <i>Trp</i> <i>B. subtilis</i>	<i>leu</i> , <i>Trp</i>	[47]
pTB90	4,4	pTB19	Km, Tc	[48]
pPL608	3,5	pUB110, ген <i>cat-86</i> <i>B. pumilus</i> , промотор фага SPO2	Km, Cm	[49]
pPL708	3,3	pPL608, полилинкер фага M13mp7	Km, Cm	[50]

¹⁾ См. примечания к табл. 2.Таблица 4. Челночные векторы, реплицирующиеся в *E. coli* и *B. subtilis*

Плазмида	Мол. масса ($\times 10^{-6}$)	Родительские плазмиды	Маркеры ¹⁾		Ссылка
			<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	
pHV14	4,6	pC194, pBR322	Cm	Ap, Cm	[3]
pHV33	4,6	pC194, pBR322	Cm	Ap, Tc, Cm	[3]
pVH23	6,1	pC194, pBR322, pT127	Tc, Cm	Ap, Cm	[47]
pOG2165	5,0	pC194, pU194, ген <i>pen-r</i> <i>B. licheniformis</i>	Ap, Cm	Ap, Cm	[51]
pJK3	5,0	pBS161-1, pBR322	Tc	Ap, Tc	[52]
pCPP-3	3,7	pBR322, pUB110, pC194	Km	Km	[53]

¹⁾ См. примечания к табл. 2.

леотидная последовательность плазмид pC194 и pE194 опубликована [20, 21]. Рестрикционные карты этих двух плазмид, а также плазмиды pUB110 представлены на рис. 1—3.

Особого внимания заслуживают гибридные или химерные плазмиды, способные реплицироваться как в клетках *E. coli*, так и в клетках *B. subtilis*. Они представлены в табл. 4. До-

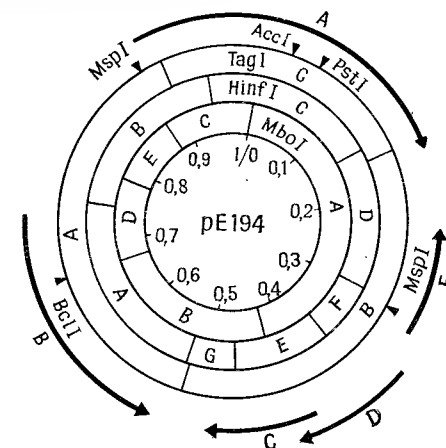


Рис. 1. Физическая карта плазмиды pE194 [20]. Стрелками обозначены открытые рамки считывания. Рамка В соответствует гену *ermC*, который кодирует метилазу, обеспечивающую устойчивость к эритромицину. Область, ответственная за репликацию, расположена во фрагменте *TagI*-B; в мутантах pE194, отличающихся количеством копий, обнаруживается точечная нуклеотидная замена в рамке Е. Точка начала репликации (в направлении против часовой стрелки) локализуется в участке 0,35—0,45 [75].

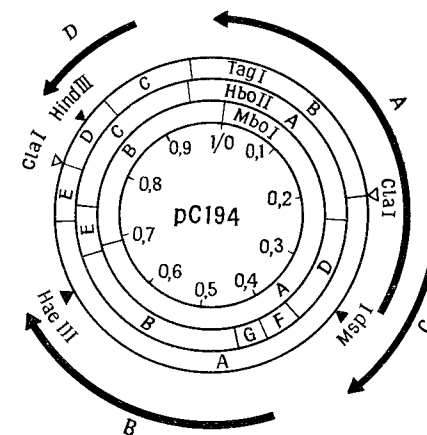
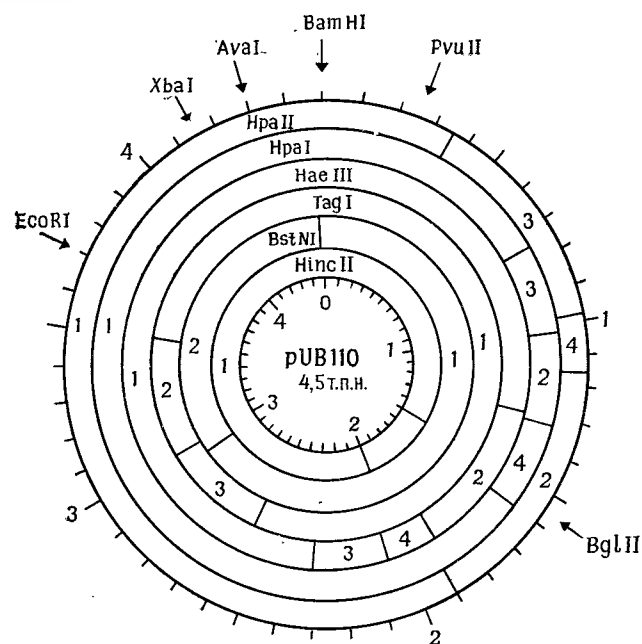


Рис. 2. Физическая карта плазмиды pC194 [21]. Стрелками показаны открытые рамки считывания. Рамка В кодирует хлорамфеникол-ацетилтрансферазу. Последовательности, участвующие в репликации, локализованы в рамке С.

вольно часто начальные этапы клонирования гораздо легче осуществить, используя в качестве бактерии-хозяина *E. coli*, а затем ввести рекомбинантный материал в *B. subtilis*.

Описано множество примеров нестабильности плазмид, особенно среди производных pC194 [2, 22—24]. Ответственная за



В качестве минимальной среды используют среду Спайца [54]; при получении компетентных клеток в нее вносят казаминокислоты и глюкозу. Среда Спайца содержит в 1 л: 2 г $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 18,3 г $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$; 6 г KH_2PO_4 ; 1 г трехзамещенного цитрата натрия (двухводного) и 0,2 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; pH 7,2.

Многие штаммы бацилл, широко применяемые в молекулярно-генетических экспериментах, плохо растут на минимальных средах без добавления казаминокислот и дрожжевого экстракта (см. табл. 6); исключение составляют бактерии CU403 [18], используемые для получения миниклеток, — этот штамм хорошо растет на минимальной среде, дополненной лишь 0,5%-ной глюкозой (по весу), метионином (100 мкг/мл) и тиминном (100 мкг/мл).

В противоположность *E. coli* *B. subtilis* — облигатный аэроб и требует хорошей аэрации на всех этапах культивирования. При выращивании в конических колбах объем культуры не должен превышать 10% от объема колбы. Для более эффективной аэрации часто применяются качалочные колбы, имеющие выступы на стенках. Жидкие культуры *Bacillus*, оставленные без встряхивания более чем на несколько минут, часто лизируются. Нормальная температура инкубации +37°C.

3. Выделение плазмидной ДНК

3.1. Препаративное выделение плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК можно использовать модифицированные методы выделения плазмид из *E. coli*. Ниже приведен метод выделения плазмид из клеток *B. subtilis*, основанный на разработке Бирнбойма и Доли [55]; приготовление необходимых растворов описано в табл. 5.

1. Нарастите 250 мл культуры в VY- или L-бульоне при 30° и интенсивной аэрации в двухлитровой колбе в течение 18 ч. В качестве инокулята используйте несколько колоний, взятых со свежей чашки.

2. Осадите клетки центрифугированием в роторе Sorvall GSA (или эквивалентном) при 10 000 об/мин в течение 10 мин.

3. Ресуспандируйте осадок в 4,8 мл раствора I, содержащего 2 мг/мл лизоцима. Инкубируйте 5 мин при 30° и затем 10 мин во льду.

4. Добавьте 9,6 мл раствора II. Перемешайте встряхиванием и оставьте на 5 мин во льду.

5. Добавьте 7,2 мл раствора III. Встряхните и оставьте на 20 мин во льду.

6. Центрифугируйте смесь при 4°C в роторе Sorvall SS 34 (или эквивалентном) при 12 000 об/мин в течение 15 мин.

Таблица 5. Растворы для препаративного и аналитического выделений плазмидной ДНК

Раствор I		
Глюкоза	9,9 г	(50 мМ)
ЭДТА	3,7 г	(10 мМ)
Трис	3,0 г	(25 мМ)
Воды до 1 литра; довести pH до 8,0, добавляя HCl.		
Раствор II		
NaOH	8,0 г	(0,2 М)
SDS	10,0 г	(1% вес/объем)
Воды до 1 литра. Использовать свежеприготовленный раствор.		
Раствор III		
Ацетат натрия pH 4,8	(3 М)	
246 г/литр. Доводить pH до 4,8, добавляя уксусную кислоту		
Раствор IV		
Ацетат натрия	8,2 г	(0,1 М)
Трис	6,05 г	(50 мМ)
Воды до 1 литра; довести pH до 8,0, добавляя HCl		

7. Перенесите надосадочную жидкость в новую пробирку и добавьте 13 мл изопропанола. Перемешайте и оставьте при —20°C на 15 мин для того, чтобы сформировался осадок нуклеиновых кислот.

8. Осадите нуклеиновые кислоты центрифугированием при 4°C в роторе Sorvall SS 34 (или эквивалентном) при 15 000 об/мин в течение 5 мин. Удалите надосадочную жидкость.

9. Высушите осадок в вакуумном эксикаторе и затем ресуспандируйте в 4,3 мл буфера TE (10 мМ трис-HCl; 1 мМ ЭДТА; pH 7,5).

10. К 3,9 мл суспензии добавьте 3,85 г CsCl. После того как весь CsCl растворится, внесите 160 мкл 1%-ного раствора (по весу) этидиумбромид.

11. Перенесите раствор в ультрацентрифужные пробирки с крышками типа Бескман и наложите минеральное масло до верха пробирки. Закройте пробирки, руководствуясь инструкцией производителя, и центрифугируйте при 40 000 об/мин в течение по меньшей мере 18 ч при 15°C в роторе Бескман Ti 70 (можно использовать эквивалентные угловые и вертикальные роторы других фирм).

3.2. Метод выделения небольших количеств плазмидной ДНК

Небольшие количества плазмидной ДНК можно получить с помощью процедуры Бирнбойма и Доли [55]. Однако выход может оказаться неудовлетворительным (особенно для видов

бацилл, отличных от *B. subtilis*) в тех случаях, когда используется ночная культура. Гораздо лучший результат получится, если инокулировать жидкую среду свежими колониями и инкубировать непродолжительное время — всего 2—3 ч — до достижения оптической плотности (ОП), приблизительно равной 1.

1. Нарастите 1,5 мл культуры в VY- или L-бульоне в 5 или 10 мл пробирке до ОП₆₀₀ приблизительно равной 1. В идеале к этому моменту культура должна еще оставаться в логарифмической фазе роста.

2. Осадите клетки центрифугированием в микроцентрифуге в течение 1 мин.

3. Ресуспенсируйте осадок в 100 мкл раствора I, содержащего 2 мг/мл лизоцима. (Лизоцим следует добавлять в раствор I непосредственно перед использованием.) Оставьте пробирку на 15 мин во льду.

4. Добавьте 200 мкл раствора II. Перемешайте встряхиванием и оставьте во льду на 5 мин.

5. Добавьте 150 мкл раствора III. Встряхните и оставьте во льду на 1 ч.

6. Центрифугируйте при 4 °C в течение 5 мин на максимальной скорости микроцентрифуги.

7. Перенесите надосадочную жидкость в новую пробирку и добавьте 1 мл этанола. Выдерживайте при —70 °C в спиртовой бане с сухим льдом в течение 10 мин.

8. Центрифугируйте при 4 °C в течение 10 мин на максимальной скорости микроцентрифуги.

9. Аккуратно удалите надосадочную жидкость и ресуспенсируйте осадок в 100 мкл раствора IV.

10. Добавьте 250 мкл этанола. Встряхните и центрифугируйте в микроцентрифуге при 4 °C в течение 10 мин.

11. К осадку добавьте 400 мкл этанола. Центрифугируйте в микроцентрифуге при 4 °C в течение 2 мин.

12. Удалите надосадочную жидкость, высушите осадок в вакуумном эксикаторе и затем ресуспенсируйте в 30 мкл буфера TE. Храните при —20 °C.

4. Приготовление и хранение компетентных клеток

В клетки бацилл плазмиды можно вводить четырьмя способами: трансформацией компетентных клеток, трансформацией протопластов, трансдукцией с помощью бактериофага AR9 (см., например, 41), а также мобилизацией с использованием конъюгативной плазмиды pAMβ1 [56], имеющей широкую хозяйскую специфичность.

При работе с *B. subtilis* применяют трансформацию компетентных клеток и протопластов. Для других видов бацилл методы получения компетентных клеток пока не разработаны,

поэтому здесь для трансформации обычно используются протопласты.

Важное отличие *B. subtilis* от *E. coli* состоит в том, что мономерные ковалентно замкнутые кольцевые плазмиды не трансформируют эти клетки с достаточной эффективностью. Трансформацию компетентных клеток бацилл можно осуществлять лишь с помощью мультимерных плазмид [57, 58]. Полная дупликация плазмиды в виде димера или тримера на самом деле необязательна. Достаточно дублировать только часть молекулы [25]. В то же время протопласты относительно легко трансформируются мономерными плазмидами. На практике мономерные молекулы при трансформации протопластов оказываются даже более эффективными, чем мультимеры. Поскольку для успешной трансформации компетентных клеток *Bacillus* необходимы мультимерные плазмиды, эффективность этой процедуры можно значительно повысить, если соответствующую плазмидную ДНК сначала расщепить эндонуклеазой, имеющей на ней единственный сайт узнавания, а затем провести реакцию лигирования и получить мультимерные формы этой плазмиды.

Компетентные клетки легче приготовить и хранить, чем протопласты. Кроме того, богатая среда, используемая для регенерации протопластов, не позволяет проводить прямую селекцию по маркерам ауксотрофности, и для этой цели надо использовать метод реплик.

Степень компетентности культуры бацилл зависит от стадии роста. Для того чтобы стимулировать клетки к захвату ДНК, их выращивают на богатой среде, а затем переносят на бедную среду, где отсутствуют аминокислоты, необходимые ауксотрофным мутантам. Время, которое требуется клеткам для достижения состояния максимальной компетентности, варьирует в зависимости от штамма [54]. Следует заметить, что только малая часть клеток в компетентной культуре (около 0,1%) действительно способна принять ДНК при насыщающих концентрациях последней.

Опубликовано несколько модификаций оригинальных процедур Анагностопулоса и Спицайзена [54] (см., например, [61]); ниже мы приводим метод, основанный на разработках Дубнау и Давидов-Абельсона [60].

4.1. Метод получения компетентных клеток

1. Внесите колонию реципиентного штамма в 10 мл среды SP1 (табл. 6). Среда должна содержать аминокислоты (в концентрации 50 мкг/мл), соответствующие потребностям данного ауксотрофного штамма, и тимин (в концентрации 100 мкг/мл, если используемый штамм имеет фенотип Thy⁻). Глюкоза до-

Таблица 6. Среда для получения компетентных клеток

Среда 4×SP (для SP1 и SP2) ¹⁾	
(NH ₄) ₂ SO ₄	8 г
K ₂ HPO ₄	56 г
KH ₂ PO ₄	24 г
Трехзамещенный цитрат натрия·2H ₂ O	4 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,8 г
Казаминокислоты (Difco)	0,8 г
Дрожжевой экстракт (Difco)	4 г

1. Ратворите перечисленные ингредиенты в 1 л воды и доведите pH раствора до 7,2 с помощью NaOH.

2. Автоклавируйте 15 мин при 0,7 атм.

3. Чтобы получить среду SP1, разведите среду 4×SP в четыре раза стерильной водой и добавьте глюкозу до 0,5% (по весу), тимин до 100 мкг/мл и необходимые аминокислоты до 50 мкг/мл.

4. Среда SP2 аналогична SP1, но в нее не добавляют аминокислот.

¹⁾ Наилучшие результаты нами были достигнуты при использовании солей фирмы BDH; реагенты некоторых других фирм оказались менее пригодными.

бавляется до концентрации 0,5% (по весу). Инкубируйте в 200 мл колбе при 30 °C в течение ночи.

2. Инокулируйте 100 мл той же среды (предварительно подогретой) в колбе на 1 л ночной культурой до ОП₆₀₀ от 0,1 до 0,2. Растите в условиях интенсивной аэрации при 37 °C, отбирая аликвоты для измерения ОП каждые 30 мин. При отборе образцов старайтесь останавливать качалку лишь на самое короткое время.

3. В конце логарифмической фазы роста, определяемой по уменьшению скорости прироста оптической плотности, перенесите 10 мл SP1-культуры в 90 мл среды SP2, содержащей 0,5% глюкозы (и 100 мкг/мл тимина, если штамм имеет фенотип Thy⁻), но не содержащей аминокислот, которые были внесены в среду SP1 на предыдущих этапах культивирования.

4. Инкубируйте SP2-культуру в течение 90 мин. Точное время инкубации, необходимое для достижения клетками состояния максимальной компетентности, в какой-то степени зависит от конкретного штамма, поэтому, если необходимо получить максимально компетентные клетки, следует отбирать образцы через 30-минутные интервалы.

5. Центрифугируйте клетки при 20 °C в роторе Sorvall GSA (или эквивалентном) при 5000 об/мин в течение 10 мин.

6. Ресуспандируйте клетки в 10 мл надосадочной жидкости, предварительно добавив к ней глицерин до концентрации 10% (по объему), быстро разлейте порциями по 0,5 мл в пробирки типа Eppendorf и заморозьте в спиртовой бане с сухим льдом при -70 °C. Клетки сохраняют компетентность по крайней мере в течение 6 месяцев.

4.2. Трансформация компетентных клеток

1. Порцию компетентных клеток (0,5 мл) быстро разморозьте на водяной бане при 37 °C.

2. Перенесите клетки в коническую колбу на 50 мл, куда предварительно внесите 1—5 мкг ДНК в объеме 5—10 мкл.

3. Инкубируйте 1 ч при 37 °C при мягком покачивании.

4. Добавьте 5 мл VY- или L-среды и инкубируйте еще 1,5 ч при 37 °C при энергичном встряхивании.

5. Рассейте культуру на чашки (кровяной агар с триптозой или L-агар) с подходящим антибиотиком для селекции трансформантов. Тетрациклин, канамицин, эритромицин и хлорамфеникол используются в концентрации 5 мкг/мл; стрептомицин — 30 мкг/мл.

Эффективность трансформации можно существенно повысить, если бактерии высевать на чашки в слое верхнего агара, инкубировать некоторое время, а затем наслаивать агар, содержащий антибиотик [59, 61]. Эта процедура, альтернативная этапу 5, состоит в следующем:

Инкубируйте в течение 30 минут (вместо 1,5 ч — см. выше этап 4) и соответствующие разведения культуры смешайте с 5 мл расплавленного агара при 45 °C. Вылейте каждую смесь на чашку, содержащую 10 мл того же агара, и инкубируйте при 37 °C в течение 3 ч. Затем добавьте еще по 5 мл агара с антибиотиком; концентрации антибиотиков в среде указаны выше (см. этап 5).

4.3. Получение протопластов

Трансформация протопластов бацилл впервые описана Чангом и Козном [62]. Преимущество протопластов в том, что они способны акцептировать плазмидную ДНК в форме мономера; при этом реально компетентной оказывается весьма значительная часть популяции протопластов (50%). Кроме того, этот метод можно использовать для работы с теми многочисленными штаммами, для которых процедура приготовления компетентных клеток не разработана.

Приводимая ниже методика представляет собой модификацию метода Иманаки с соавт. [48]. Преимущество нашей методики состоит в том, что ее можно применять не только для *B. subtilis*, но также и для других видов бацилл, таких, например, как *B. licheniformis*, *B. freundenreichii* и *B. circulans*. Единственный параметр, изменяющийся в зависимости от того, какой именно вид бактерий используется в работе, — это продолжительность инкубации в лизоциме, поскольку некоторые бациллы устойчивы к его действию (например, *B. sphaericus*), тогда как другие оказываются гораздо более чувствительными.

Таблица 7. Реагенты для трансформации протопластов

SMMLBP приготавливают, смешивая равные объемы 2×SMM и LBP 2×SMM

Сахароза	342 г	(1 М)
Малеат натрия	4,72 г	(40 мМ)
MgCl ₂	8,12 г	(40 мМ)

Воды до 1 литра; довести pH до 6,5, добавив NaOH
Автоклавировать 15 мин при 0,7 атм

LBP представляет собой 2×LB-среду, содержащую поливинилпирролидон в концентрации 80 г/л

Триптон (Difco)	20 г
NaCl	10 г
Дрожжевой экстракт (Difco)	10 г
Поливинилпирролидон	80 г

Воды до 1 литра; автоклавировать 15 мин при 0,7 атм

Полиэтиленгликоль

К 40 г полиэтиленгликоля (PEG6000; Sigma) добавьте 50 мл 2×SMM, доведите объем раствора водой до 100 мл и автоклавируйте при 0,7 атм

Среда DMP для регенерации протопластов

DMP приготавливают, смешивая описанные ниже компоненты, которые предварительно стерилизуют по отдельности

а) Питательный агар

Агар (Difco)	10 г
Казаминоислоты (Difco)	5 г
Дрожжевой экстракт (Difco)	5 г

Воды до 350 мл; автоклавировать 15 мин при 0,7 атм

б) Фосфат калия

KH ₂ PO ₄	1,5 г
K ₂ HPO ₄	3,5 г

К каждой навеске добавить воды до 50 мл, растворы смешать и автоклавируют 15 мин при 1 атм

в) Глюкоза

	20 г
--	------

Воды до 100 мл; автоклавировать 10 мин при 0,7 атм

г) MgCl₂·6H₂O

	20,3 г
--	--------

Воды до 100 мл; автоклавировать 15 мин при 1 атм

д) Сукцинат натрия

Янтарная кислота (двунариевая соль)	81 г
-------------------------------------	------

Поливинилпирролидон (PVP)	80 г
---------------------------	------

Воды до 500 мл; довести pH до 7,3, добавив NaOH

Автоклавировать 10 мин при 1 атм

Автоклавированные компоненты смешивают в следующих количествах:

Сукцинат натрия+PVP	500 мл
Питательный агар	350 мл
Фосфат калия	100 мл
Глюкоза	25 мл
MgCl ₂	20 мл

Растворы рекомендуется смешивать вскоре после автоклавирования, пока они горячие. Когда среда охладится приблизительно до 50 °С, добавляют необходимые антибиотики

1. Используйте пластиковую или чистую (не содержащую следов детергента) стеклянную посуду на всех этапах эксперимента.

2. Инокулируйте 50 мл VY- или L-среды в колбе на 500 мл несколькими колониями со свежей чашки (18 ч).

3. Растите в условиях интенсивной аэрации до ОП₆₀₀=0,4.

4. Центрифугируйте культуру 10 мин при 5000 об/мин в роторе Sorvall GSA (или эквивалентном). Удалите надосадочную жидкость, а осадок ресуспендируйте в 5 мл среды SMMLBP (см. табл. 7).

5. Добавьте 260 мкл раствора, содержащего 20 мг/мл лизоцима (раствор лизоцима в SMMLBP готовят незадолго до использования и стерилизуют фильтрованием).

6. Инкубируйте при 37 °С. Через определенные промежутки времени отбирайте аликвоты и исследуйте их в фазово-контрастном микроскопе, чтобы определить количество протопластов. Когда в протопласты превратится не менее 99% клеток, добавьте 1—5 мкг ДНК в 10 мкл буфера TE (или воды) и 1,5 мл 40%-ного (по весу) раствора полиэтиленгликоля. Осторожно перемешайте и оставьте на 2 мин при комнатной температуре.

7. Добавьте 5 мл среды SMMLBP и аккуратно перемешайте.

8. Центрифугируйте 10 мин при 3000 об/мин в роторе Sorvall SS34 (или эквивалентном).

9. Ресуспендируйте протопласты в 1 мл среды SMMLBP и инкубируйте при 37° в течение 90 мин, мягко покачивая.

10. Рассейте аликвоты по 0,1 мл на чашки со средой DMP для регенерации протопластов (табл. 7), содержащей соответствующий антибиотик. Канамицин гораздо менее эффективен при введении в среду DMP, поэтому его концентрацию необходимо довести до 1 мг/мл. Тетрацилин, хлорамфеникол и эритромицин добавляют в концентрации 5 мкг/мл.

5. Методы изучения экспрессии генов в клетках бацилл

Многие экспериментальные процедуры, применяемые для изучения экспрессии генов в клетках *E. coli*, можно использовать для работы с бациллами либо без всяких изменений, либо с небольшими вариациями. Так, например, метод Брума-Гилберта [63], предназначенный для выявления антигенов, продуцируемых бактериями, можно модифицировать для бацилл, заменив инфекцию вирулентным бактериофагом на лизис клеток под действием лизоцима. По 5 мкл водного раствора лизоцима в концентрации 2 мг/мл капают на 5-миллиметровые бактериальные штрихи, выращенные на поверхности агара, и инкубируют чашки в течение 30 мин при 37 °С [64].

Чамблисс с соавторами подробно описали метод приготовления экстрактов из *B. subtilis* для транскрипции и трансляции ДНК *in vitro* [65]. Для изучения экспрессии генов в бациллах также оказываются полезными мини-клетки [18]. Ряд методов основан на способности бацилл секретировать белковые продукты. Белки, высвобождающиеся из бактериальных клеток, которые растут на поверхности нитроцеллюлозного фильтра, помещенного на L-агар, легко идентифицируются с помощью стандартной процедуры Вестерн-блоттинга [66] — достаточно лишь отмыть фильтр от бактерий.

5.1. Приготовление и мечение мини-клеток бацилл

В ряде исследований, касающихся белков, кодируемых бактериофагами и плазмидами, в качестве продуцента мини-клеток использовали штамм CU403 (табл. 1) [18]. Эти бактерии растут на минимальной среде с добавлением лишь глюкозы, тими-на и метионина. Они не лизируются при центрифугировании в градиентах концентрации сахарозы при 4°C и не образуют спор. Подобно большинству *Spo*⁻штаммов, CU403 с трудом дает компетентные клетки. Плазмиды обычно вводят в эти клетки путем трансформации протопластов.

Мини-клетки готовят и хранят как описано в табл. 8. Из 400 мл исходной культуры обычно можно получить 2 мл суспензии мини-клеток с ОП₆₀₀=0,5, что соответствует приблизительно 5·10⁹ мини-клеток/мл. Удовлетворительное включение метки получается в том случае, если количество жизнеспособных клеток не превышает 5·10³ на 10⁹ мини-клеток. Ниже приведена экспериментальная процедура мечения мини-клеток.

1. Дайте мини-клеткам оттаять, поместив их на водяную баню при 48°C.

2. Центрифугируйте суспензию мини-клеток в течение 90 с в микроцентрифуге на максимальной скорости.

3. Ресуспандируйте мини-клетки в 0,2 мл смеси, включающей 1 объем 0,4%-ной (по весу) среды для определения метионина (Difco), 3 объема минимальной среды, содержащей 100 мкг/мл тими-на и 0,5% (по весу) глюкозы.

4. Добавьте 0,1 мл раствора D-циклосерина (500 мкг/мл) и инкубируйте при 37°C 10 мин.

5. Внесите 100 мкКи [³⁵S] метионина (70 Ки/ммоль) и инкубируйте при 37°C 30 мин на качалке в пробирке на 5 мл.

6. Добавьте 0,1 мл раствора метионина (0,2 мг/мл) и инкубируйте при 37°C 10 мин.

7. Центрифугируйте 90 с в микроцентрифуге на максимальной скорости. Удалите радиоактивную надосадочную жидкость.

8. Ресуспандируйте осадок мини-клеток в 1 мл воды. Цент-

Таблица 8. Приготовление мини-клеток

1. Выращите культуру штамма CU403 при 30°C в течение ночи в 100 мл L- или VY-среды в колбе на 1 л.

2. Внесите некоторое количество этой культуры в 400 мл минимальной среды¹⁾, содержащей 0,5% (по весу) глюкозы, 100 мкг/мл метионина и 100 мкг/мл тими-на, до достижения ОП₆₀₀=0,1—0,2. Растите в двухлитровой колбе при энергичном перемешивании до ОП₆₀₀=1,0. Поместите колбу на лед, чтобы охладить клетки.

3. Центрифугируйте при 0°C в роторе Sorvall GSA (или эквивалентном) в течение 10 мин при 10 000 об/мин, удалите надосадочную жидкость и энергично ресуспандируйте осадок в 5 мл холодной минимальной среды без глюкозы, метионина и тими-на.

4. Аккуратно наклоните суспензию на два 25 мл сахарозных градиента²⁾ (5—35%) в пробирках Correx. Центрифугируйте при 0°C в бакет-роторе Sorvall HB-4 (или эквивалентном) при 5000 об/мин в течение 20 мин.

5. Отберите фракцию мини-клеток, которая сформируется в виде полосы в центральной части градиента, с помощью пастеровской пипетки с изогнутым V-образным кончиком.

6. Осадите собранные мини-клетки центрифугированием при 0°C в роторе Sorvall SS34 (или эквивалентном) в течение 20 мин при 5000 об/мин.

7. Ресуспандируйте мини-клетки в двух 5 мл аликвотах холодной минимальной среды и повторите этапы 4—6.

8. Дважды промойте мини-клетки, ресуспандируя их в 5 мл холодной минимальной среды и центрифугируя затем при 0°C в роторе Sorvall SS34 (или эквивалентном) в течение 10 мин при 12 500 об/мин.

9. Если мини-клетки не будут сразу использоваться для включения метки, их можно сохранить, ресуспандировав в 3 мл холодной минимальной среды, содержащей 10%-ный (по объему) глицерин, заморозив в спиртовой бане с сухим льдом и поместив в морозильную камеру на —70°C.

¹⁾ Минимальная среда Спидайзена (см. раздел 2.5), с добавлением 0,5 мМ CaCl₂; 0,1 мМ MnSO₄, 0,005 мМ FeCl₃. Стерилизовать автоклавированием.

²⁾ Сахарозные градиенты удобно готовить по методу Стоуна [68]: в центрифужной пробирке Correx наклоните 12,5 мл 5%-ного (по весу) раствора сахарозы в минимальной среде на 12,5 мл 35%-ного раствора. Наклоните пробирку и оставьте ее под углом 30° на 18 ч при 4°C.

рифугируйте 90 с в микроцентрифуге на максимальной скорости и удалите надосадочную жидкость.

9. Ресуспандируйте мини-клетки в 50 мкл водного раствора лизоцима (0,5 мг/мл) и инкубируйте 2 мин при 37°C.

10. Добавьте 100 мкл буфера для нанесения на гель (0,0625 М трис-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 5% 2-меркаптоэтанола; 10% глицерина; 0,002% бромфенолового синего).

11. Прогрейте пробу при 100°C в течение 3 мин и нанесите на 12% ПААГ (процентное содержание акриламида в геле можно изменить в соответствии со свойствами конкретных изучаемых белков). Гель приготавливают, например, по методике, данной в [69]. В лунку наносите приблизительно 50 000 имп/мин.

12. По окончании электрофореза [69] окрашивайте гель в течение 4—8 ч в водном растворе, содержащем 40% (по объему) уксусной кислоты, 20% (по объему) метанола, 0,1% (по

весу) кумасси голубого. Промойте гель в водном растворе 10%-ной (по объему) уксусной кислоты с 30%-ным метанолом и поместите в скантillator типа Enhance (New England Nuclear) на 1 ч. Промывайте гель в течение 1 ч, два раза меняя воду, высушите в вакууме и экспонируйте с ним рентгеновскую пленку (Kodak X-Omat R) при -70°C [70].

5.2. Использование гена устойчивости к эритромицину (*ermC*) для экспрессии клонированных генов

Ген *ermC* плазмиды pE194 [71] кодирует РНК-метилазу, которая катализирует специфическое N^6, N^6 -диметилирование рибосомной РНК, что определяет устойчивость клетки к действию эритромицина [72]. Синтез этой редуктазы индуцируется субингибирующими концентрациями эритромицина [72]. Индукция осуществляется на уровне трансляции мРНК, поэтому в данном случае речь не идет об идеальном транскрипционно контролируемом промоторе, который был бы особенно полезен для экспрессии клонированных генов. Тем не менее этот ген регулируется, что позволяет получать довольно высокий выход чужеродного белка в *Bacillus* (не менее 1% от тотального клеточного белка) [64].

Часто оказывается более целесообразным сначала получить рекомбинантную плазмиду в *E. coli*, а затем перевести ее в *B. subtilis*. Подобно многим стафилококковым и бациллярным генам лекарственной устойчивости, стафилококковый ген *ermC* плазмиды pE194 функционирует в *E. coli* [73]. Однако *E. coli* сама по себе устойчива к эритромицину, и чтобы отличить трансформантов от клеток, не несущих ген *ermC*, необходимо значительно увеличить концентрацию эритромицина в среде или использовать штаммы с повышенной чувствительностью к этому антибиотику [73]. Инактивация гена *ermC* в высокочувствительном штамме DB11 распознается по чувствительности клеток к эритромицину при его концентрации в L-агаре 5 мкг/мл. Рекомбинантные плазмиды, имеющие вставку внутри гена *ermC*, таким образом, легко идентифицируются в *E. coli*. Существуют химерные (несущие ген *ermC*) плазмиды, которые способны реплицироваться как в *E. coli*, так и в *Bacillus* — например, рКН80, сконструированная из рBD9 и рBR322 [63]. Перед введением в клетки *B. subtilis* та часть этой плазмиды, которая обуславливает родство к *E. coli*, может быть легко удалена.

В типичных экспериментах по изучению продукции чужеродного белка под контролем гена *ermC* [64] клетки выращивали в VY-среде до $\text{ОП}_{600} = 0,2$, затем добавляли эритромицин до концентрации 0,05 мкг/мл (субингибирующая концентрация) и инкубировали культуру еще 2 ч в условиях интенсивной аэра-

ции. Затем клетки разрушали ультразвуком и полученные экстракты анализировали на присутствие чужеродного белка с помощью вестерн-блот-анализа [66] или другими методами.

Хлорамфеникол-устойчивость *B. pumilus*, по всей видимости, также контролируется на трансляционном уровне; возможность использования соответствующего промотора для экспрессии клонированных генов была детально изучена Ловеттом с соавт. [49, 50].

Благодарности

Я весьма признателен С. Д. Эрлиху, взявшему на себя труд написать вводную часть этой главы.

Литература

1. Keggins K. M., Lovett P. S., Duvall E. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1423 (1978).
2. Gryczan T. J., Dubnau D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1428 (1978).
3. Ehrlich S. D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1433 (1978).
4. Palva I., Lehtovaara P., Kääriäinen L., Sibakov M., Cantell K., Schein C. H., Kashiwagi K., Weissmann C. Gene, 22, 229 (1983).
5. Mosbach K., Birnbaum S., Hardy K., Davies J., Bulow L. Nature, 302, 543 (1983).
6. Losick R. In: Molecular Biology of the Bacilli, Dubnau D. (ed.), Academic Press, New York, p. 179 (1982).
7. Ehrlich S. D., Niaudet B., Michel B. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 96, 19 (1982).
8. Hemphill H. E., Whiteley H. R. Bacteriol. Rev., 39, 257 (1975).
9. Okamoto K., Mudd J. A., Marmur J. J. Mol. Biol., 34, 429 (1968).
10. Dubnau D., Cirigliano C. J. Bacteriol., 117, 488 (1974).
11. Tanaka T. J. Bacteriol., 139, 775 (1979).
12. Ehrlich S. D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 1680 (1977).
13. Tanaka T. Mol. Gen. Genet., 175, 235 (1979).
14. Trautner T. A., Pawlek B., Bron S., Anagnostopoulos C. Mol. Gen. Genet., 131, 181 (1974).
15. Gordon R. E., Haynes W. C., Pang C. H.-N. The Genus Bacillus, U.S. Dept of Agriculture, Washington, DC, 1973.
16. Wilson G. A., Young F. E., J. Bacteriol., 111, 705 (1972).
17. Yasbin R. E., Fields P. I., Anderson B. J. Gene, 12, 155 (1980).
18. Reeve J. In: Methods in Enzymology, Wu R. (ed.), Academic Press Inc., London and New York, Vol. 68, p. 493 (1979).
19. Polak J., Novick R. P. Plasmid, 7, 152 (1982).
20. Horinouchi S., Weisblum B. J. Bacteriol., 150, 804 (1982).
21. Horinouchi S., Weisblum B. J. Bacteriol., 150, 815 (1982).
22. Goze A., Ehrlich S. D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 7333 (1980).
23. Kreft J., Hughes C. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 96, 1 (1982).
24. Uhlen M., Flock J. I., Philipson L. Plasmid, 5, 161 (1981).
25. Michel B., Niaudet B., Ehrlich S. D., EMBO J., 1, 1565 (1982).
26. Copeland J. C., Marmur M. J. Bacteriol. Rev., 32, 302 (1968).
27. Kawamura F., Saito H., Ikeda Y. Gene, 5, 89 (1979).
28. Yamasaki H., Ohmura K., Nakayama A., Takeichi Y., Otazaki K., Yamasaki M., Tamura G., Yamane K. J. Bacteriol., 156, 327 (1983).
29. Iijima T., Kawamura J., Saito H., Ikeda Y. Gene, 5, 87 (1979).

30. Flock J. I. Mol. Gen. Genet., 189, 304 (1983).
31. Marrero R., Lovett P. S. J. Bacteriol., 143, 879 (1980).
32. Yoneda Y., Graham S., Young F. E. Gene, 7, 51 (1979).
33. Heilmann H., Reeve J. N. Gene, 17, 91 (1982).
34. Bernhard K., Schrempf H., Goebel W., J. Bacteriol., 133, 879 (1978).
35. Bingham A. H. A., Bruton C. J., Atkinson T. J. Gen. Microbiol., 114, 401 (1979).
36. Lovett P. S., Duvall E. J., Keggins K. M. J. Bacteriol., 127, 817 (1979).
37. Lovett P. S., Duvall E. J., Bramucci M. G., Taylor R. Antimicrob. Agents Chemother., 12, 435 (1977).
38. Mahler I., Halvorson H. O. J. Gen. Microbiol., 120, 259 (1980).
39. Tanaka T., Koshikawa T. J. Bacteriol., 131, 699 (1977).
40. Yoshimura K., Yamamoto O., Seki T., Oshima Y. Appl. Environ. Microbiol., 45, 1733 (1983).
41. Gryczan T. J., Contente S., Dubnau D. J. Bacteriol., 134, 318 (1978).
42. Iordanescu S. J. Bacteriol., 124, 597 (1975).
43. Löjdahl S., Sjöström J. E., Philipson L. Gene, 3, 161 (1978).
44. Gryczan T. J., Shivakumar A. G., Dubnau D. J. Bacteriol., 141, 246 (1980).
45. Michel B., Palla E., Naudet B., Ehrlich S. D. Gene, 12, 147 (1980).
46. Keggins K. M., Lovett P. S., Marrero R., Hoch S. O. J. Bacteriol., 139, 1001 (1979).
47. Tanaka T., Kawano N. Gene, 10, 131 (1980).
48. Imanaka T., Fujii M., Aramori I., Aiba S. J. Bacteriol., 149, 824 (1982).
49. Schoner R. G., Williams D. M., Lovett P. S. Gene, 22, 47 (1983).
50. Duvall E. J., Williams D. M., Lovett P. S., Rudolph C., Vasantha N., Guyer M. Gene, 24, 171 (1983).
51. Gray O., Chang S. J. Bacteriol., 145, 422 (1981).
52. Kreft J., Bernhard K., Goebel W. Mol. Gen. Genet., 162, 59 (1978).
53. Band L., Yansura D. G., Henner D. J. Plasmid, 26, 313 (1983).
54. Anagnostopoulos C., Spizizen J. Bacteriol., 81, 741 (1961).
55. Birnboim H. C., Doly J. Nucleic Acids Res., 7, 1513 (1979).
56. Clewell D. Microbiol. Rev., 45, 409 (1981).
57. Canosi U., Morelli G., Trautner T. A. Mol. Gen. Genet., 166, 259 (1978).
58. Mottes M., Grandi G., Sgarbetta V., Canosi U., Morelli G., Trautner T. A. Mol. Genet., 174, 281 (1979).
59. Naudet B., Ehrlich S. D. Plasmid, 2, 48 (1979).
60. Dubnau D., Davidoff-Abelson R. J. Mol. Biol., 56, 209 (1971).
61. Contente S., Dubnau S. D. Mol. Gen. Genet., 167, 251 (1979).
62. Chang S., Cohen S. N. Mol. Gen. Genet., 168, 111 (1979).
63. Broome S., Gilbert W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 2746 (1978).
64. Hardy K., Stahl S., Küpper H. Nature, 293, 481 (1981).
65. Chambliss G. H., Henkin T. M., Levinthal J. M. Methods in Enzymology, 101, 598 (1983).
66. Burnette W. N. Anal. Biochem., 112, 195 (1981).
67. Mertens G., Reeve J. N. J. Bacteriol., 129, 1198 (1977).
68. Stone A. B., Biochem. J., 137, 117 (1974).
69. Laemmli U. K. Nature, New Biol., 227, 680 (1970).
70. Bonner W. H., Laskey R. A. Eur. J. Biochem., 46, 83 (1974).
71. Shivakumar A. G., Dubnau D. Nucleic Acids Res., 11, 2549 (1981).
72. Weisblum B. In: Microbiology-1974, Schlessinger D. (ed.), American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 199, 1975.
73. Hardy K., Haejeli C. J. Bacteriol., 152, 524 (1982).
74. Jalanko A., Palva I., Soderlund H. Gene, 14, 325 (1981).
75. Scheer-Abramowitz J., Gryczan T. J., Dubnau D. Plasmid, 6, 67 (1981).

КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНОВ В СТРЕПТОМИЦЕТАХ

Айан С. Хантер

1. Введение

Методы клонирования генов в *Streptomyces* разработаны относительно недавно. Первый опыт молекулярного клонирования в этом микроорганизме относится к 1980 г. [1]. В настоящее время рекомбинантная технология позволяет нам использовать стрептомицеты в таких экспериментах, которые прежде были неосуществимы. Основы молекулярной биологии стрептомицетов были заложены в лаборатории Хопвуда и явились итогом более чем 25-летней исследовательской деятельности этой лаборатории в области генетики актиномицетов.

Streptomyces — это грамположительные почвенные микроорганизмы. Их геном имеет размер приблизительно 10^4 т.п.н. и представлен единственной кольцевой хромосомой. Наиболее изученный вид — *S. coelicolor* A3 [2]; для него разработана подробная генетическая карта [2], на которой указаны специфические позиции ауксотрофных и ферментных мутаций, мутаций, затрагивающих дифференцировку. *S. coelicolor* является моделью дифференцирующегося прокариотического организма; клонирование генов, ответственных за дифференцировку, без сомнения поможет разобраться в сложностях этого процесса.

На протяжении последних нескольких лет молекулярно-биологические исследования рода *Streptomyces* главным образом были направлены на совершенствование генно-инженерной технологии. Теперь этот этап практически завершен, и разработанные методы должны помочь в решении фундаментальных проблем биологии стрептомицетов, в частности вопросов, касающихся выработки ими антибиотиков. Стрептомицеты служат продуцентами большого числа различных по своей природе антибиотиков, многие из которых представляют коммерческий интерес; каждый штамм способен вырабатывать несколько видов таких молекул. Так, например, *S. coelicolor* производит четыре различных антибиотика [3], а некоторые другие виды (например, *S. clavuligerus*) — свыше 30.

Более 60% известных антибиотиков природного происхождения являются продуктами жизнедеятельности стрептомицетов [4]. Вот почему этот объект занимает центральное место в поисковых программах фармацевтических фирм, направленных на

выделение новых природных изолятов. Технология рекомбинантных ДНК может оказаться весьма полезной как при отборе и селекции нужных микроорганизмов, так и для повышения титра продуцентов новых антибиотиков. Планируется также использовать генно-инженерные разработки для получения новых биологически активных молекул, не имеющих природных аналогов. Это может быть достигнуто, например, клонированием генов, обеспечивающих синтез антибиотиков одного продуцента в других хозяевах. В «эру биотехнологии» коммерческие аспекты производства антибиотиков способствуют активной разработке проблемы.

К настоящему времени об экспрессии генов, участвующих в синтезе антибиотиков, известно относительно немного, однако работы, посвященные клонированию генов, детерминирующих соответствующие биосинтетические процессы, начинают появляться в печати [5, 6]. Недавно [7] в мутантах *S. coelicolor* удалось клонировать гены всего биосинтетического пути актинородина — антибиотика, в норме продуцируемого *S. coelicolor*. Клонированные гены были введены в *S. parvulus*, т. е. в гетерологичного хозяина, в норме не являющегося продуцентом данного антибиотика, после чего трансформированный *S. parvulus* стал секретировать актиноридин. Этот изящный эксперимент продемонстрировал возможности межвидового клонирования ДНК.

2. Стратегия клонирования ДНК в стрептомицетах

2.1. Хозяйский штамм

Планирование любого эксперимента по молекулярному клонированию начинается с выбора хозяйского штамма стрептомицетов. Этот пункт, возможно, кажется тривиальным, однако довольно часто недооценка его важности приводит к серьезным неудачам. Подходящий штамм можно выбрать, руководствуясь приведенными ниже критериями.

2.1.1. Фенотип хозяина

В большинстве случаев стратегия скрининга банка генов стрептомицетов основывается на фенотипическом выражении клонированного гена. Это означает, что реципиент должен быть дефектным по энзиматической активности, которая могла бы комплементировать продуктом данного гена, клонированного в подходящем векторе. Например, для того, чтобы клонировать ген лекарственной устойчивости, необходим чувствительный к данному лекарственному агенту хозяин. Клонирование гена, вовлеченного в биосинтез аминокислоты, требует хозяина, специфически ауксотрофного по этой аминокислоте, поскольку не-

обходимо, чтобы отсутствовал продукт этого гена. В первом случае предпочтительнее реципиент, в норме чувствительный к данному лекарственному препарату, так как в этом случае исключается реверсия; чувствительный мутант, выделенный из родительского штамма, имеющий фенотипически выраженную лекарственную устойчивость, может с высокой частотой ревертировать к дикому типу и поэтому нежелателен. К сожалению, в случае ауксотрофного хозяина неизбежно приходится работать с мутантом. Здесь следует удостовериться, что частота реверсий данного реципиента к прототрофности относительно низкая. Стандартные методики направленного мутагенеза стрептомицетов с целью получения ауксотрофов описаны в литературе [9]. Потенциальные хозяева должны проверяться на чувствительность к селекционным агентам, обычно используемым в комбинации с векторами для клонирования в стрептомицетах, — тиострептону, неомицину, виомицину и эритромицину.

2.1.2. Эффективность трансформации и эффективность регенерации

Раздел 2.3 касается статистического анализа банков генов. Приведенные в нем данные говорят о том, что если эффективность трансформации протопластов стрептомицетов интактным вектором не превышает 10^5 /мкг (что соответствует приблизительно 10^3 /мкг для вектора в лигазной реакции), то для создания банка генов потребуются неприемлемо большие количества ДНК.

1. Кажущаяся низкая эффективность трансформации может объясняться не собственно нарушением нормального трансформационного процесса, а неэффективной регенерацией трансформированных протопластов. В этом случае для повышения эффективности регенерации можно воспользоваться рекомендациями, приведенными в разд. 4.6.

2. Если недостаточно эффективной оказывается именно трансформация, возможно, потребуется замена вектора. Так, например, *S. rimosus* трансформируется нерасщепленными векторами семейства SCP2* с эффективностью, меньшей 10^3 /мкг, тогда как использование репликонов rIJ101 дает величину, превышающую 10^6 /мкг.

3. Если же эффективность трансформации не удается поднять до 10^5 средствами, предлагаемыми в пунктах 1 и 2, необходимо заменить хозяина.

2.1.3. Активность хозяйских систем рестрикции

Если в соответствии с рекомендациями, изложенными в разд. 2.1.1, планируется использовать гетерологического хозяина, необходимо оценить его рестрикционную активность. Многие представители рода *Streptomyces* имеют активные системы

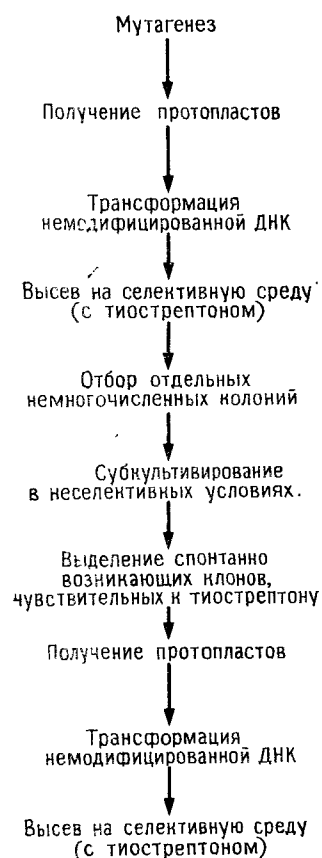


Рис. 1. Стратегия селекции штаммов *Streptomyces*, дефектных по системе рестрикции.

хорошо охарактеризован, поскольку возможны технические трудности, связанные с трансформацией донора (например, получение и регенерация протопластов и т. д.).

Другой, менее строгий тест можно провести, используя бифункциональный (*Streptomyces/E. coli*) вектор. Для этого плазмидную ДНК выделяют из *E. coli*; хозяйский штамм *Streptomyces*, у которого полностью отсутствует рестрикционная активность, будет трансформироваться этой ДНК с такой же эффективностью, как и плазмидной ДНК, выделенной из самого хозяйского штамма. Таким путем было, например, показано, что *S. ambofaciens* лишен рестрикционной активности [14].

рестрикции. В особенности это касается промышленных штаммов, которые отбираются с учетом их приспособленности к культивированию в больших ферментерах. Высокая рестрикционная активность защищает их от фаговой инфекции. При использовании этих штаммов в качестве реципиентов в экспериментах по молекулярному клонированию донорная ДНК может распознаваться системами рестрикции как чужеродная и элиминироваться, вследствие чего оказывается невозможным получить представительный банк генов.

Лучший способ проверить наличие рестрикционного барьера между донором и реципиентом заключается в том, что донорный штамм трансформируют плазмидой, выделяют из трансформантов плазмидную ДНК и затем ею трансформируют реципиентный штамм. Если рестрикционного барьера нет, эффективность последней трансформации будет сравнима с эффективностью контрольной трансформации, когда плазмиду выделяют из реципиентного штамма и снова вводят в протопласты реципиента. Низкая по сравнению с контрольным экспериментом эффективность трансформации свидетельствует о наличии рестрикционного барьера. Этот способ проверки, однако, неприменим в тех случаях, когда донорный штамм недостаточно

Если же в хозяйском штамме предполагается наличие рестрикционной активности, у исследователя остаются три возможности.

1. Выбрать другой штамм — это радикальное решение проблемы.
2. Попытаться получить мутанты хозяйского штамма с пониженной активностью системы рестрикции.
3. Подвергнуть протопласты тепловому шоку, чтобы ингибировать их рестрикционную активность.

Второй путь (рис. 1) был успешно опробован на промышленном штамме *S. rimosus*. Полученные мутанты фенотипически оказались дефектными по рестрикции (хотя энзимологические аспекты нарушения специально не исследовались) [10]. Изначально *S. rimosus* плохо трансформировался ДНК рPZ33 (бифункциональный вектор *E. coli*/*Streptomyces* на основе pIJ101 — см. разд. 2.2.1), выделенной из *E. coli* ($2 \cdot 10^2$ /мкг), и хорошо — этой же плазмидной ДНК, выделенной из *S. rimosus* ($7 \cdot 10^5$ /мкг). Мутантный штамм трансформировался плазмидной ДНК из *E. coli* с эффективностью $6 \cdot 10^5$ /мкг, что указывает на отсутствие рестрикционного барьера между *E. coli* и *S. rimosus*.

Третий путь предусматривает 10—15-минутную инкубацию протопластов при 40—50 °C для того, чтобы инактивировать ферменты рестрикции. Протопласты в этих условиях остаются жизнеспособными и сохраняют способность к трансформации. Точное значение температуры и продолжительность обработки подбираются эмпирически для каждого штамма. К сожалению, не все штаммы обладают термолabileй системой рестрикции.

2.1.4. ДНКазная активность хозяйского штамма

Некоторые стрептомицеты продуцируют активные ферменты, вызывающие деградацию ДНК [11]. Эти ферменты могут выделяться в среду культивирования интактными протопластами или накапливаться там за счет лизиса части протопластов. Таким образом, при добавлении плазмидной ДНК к суспензии протопластов эта ДНК может частично разрушаться и утрачивать трансформирующую активность.

ДНКазную активность протопластов можно оценить следующим образом. Известное количество плазмидной ДНК добавляют к суспензии протопластов, инкубируют короткое время, после чего протопласты осаждают центрифугированием в микроцентрифуге. Надосадочную жидкость наносят на агарозный гель и проводят электрофорез для качественной оценки ДНК. Если наблюдается деградация ДНК, стоит проверить, не инактивируется ли ДНКазная активность тепловым шоком (см. разд. 2.1.3), хотя это маловероятно. Добавление к суспензии

протопластов гетерологичной ДНК (например, ДНК тимуса теленка) до введения плазмидной ДНК обеспечивает частичную защиту от ДНКаз. Добавление тимусной ДНК (по крайней мере в количестве до 100 мкг к 100 мкл протопластов) не оказывает ощутимого влияния на трансформацию плазмидной ДНК.

2.1.5. Активность системы рекомбинации хозяина

Стрептомицетам свойственна высокая рекомбинационная активность. Между тем использование дефектного по рекомбинации стрептомицета-хозяина могло бы свести к минимуму вероятность делеции или перестройки клонированных фрагментов ДНК. Хотя известен ряд мутантов *Streptomyces*, которые чувствительны к УФ облучению, нет сколько-нибудь достоверных данных о селекции дефектных по рекомбинации штаммов. Подобный штамм можно смело назвать мечтой всех исследователей, работающих в данной области. И если таковой появится, ему, без сомнения, следует отдать предпочтение.

2.2. Вектор

В научной и патентной литературе описано большое число плазмид стрептомицетов. Поэтому выбор векторов нельзя назвать ограниченным, просто некоторые из них разработаны и охарактеризованы лучше, а другие — хуже.

Свойства векторов сильно различаются и удовлетворяют самым разным требованиям. Это могут быть высоко- и низкокопийные плазмиды или представленные одиночными копиями лизогенизирующие фаги. Плазмидные векторы могут быть трансмиссибельными или нетрансмиссибельными; они могут быть криптоическими и идентифицироваться благодаря феномену «летального зигозиса» (когда колония, содержащая плазмиду при репликации на газон растущих бесплазмидных клеток, образует прозрачную зону — см. раздел. 4.7.1) либо могут нести детерминанты лекарственной устойчивости.

2.2.1. Высококопийные векторы

Известно несколько высококопийных векторов (см. ниже). Предпочтительно использовать векторы на основе pIJ101, поскольку все они хорошо изучены и обладают высокой эффективностью трансформации.

Высококопийные векторы выделить несложно; они с успехом использовались во многих недавних экспериментах по молекулярному клонированию. Число их копий в клетке может достигать столь высокого значения, что гиперэкспрессия некоторых

клонированных в них генов оказывается вредной для клетки. Малпартида и Хопвуд [7] клонировали в составе низкокопийного вектора два фрагмента ДНК, кодирующих фрагменты метаболического пути одного из антибиотиков. Эти фрагменты упорно «сопротивлялись» клонированию в составе высококопийного вектора. Не удалось также в дальнейшем переклонировать участки этих последовательностей из низкокопийного вектора в высококопийный. Можно предположить (хотя это и не доказано), что в данном случае гиперэкспрессия некоторых клонированных генов оказывается летальной для клетки. Этот аспект молекулярной биологии стрептомицетов следует иметь в виду при выборе стратегии клонирования.

pIJ101. Плазмиды, являющиеся производными pIJ101, часто используются для экспериментов типа «шотган» (т. е. для клонирования ДНК, фрагментированной случайным образом). pIJ101 — одна из представительниц семейства плазмид, выделенных из штамма *S. lividans* [12]. Штамм содержит еще три плазмиды меньшего размера, которые, по данным рестрикционного анализа, представляют собой делеционные варианты родительской плазмиды (pIJ101), возникшие in vivo. pIJ101 относится к трансмиссибельным плазмидам и экспрессирует летальный зигозис (разд. 4.7.1). Анализ поведения делеционных мутантов in vivo и in vitro позволил осуществить предварительное картирование соответствующих генетических детерминант [12]. pIJ101 (9 т.п.н.) обладает самой широкой хозяйской специфичностью из всех известных на сегодняшний день плазмид стрептомицетов. Например, в оригинальной публикации [12] сообщалось, что эта плаزمид «прижилась» в 13 из 18 опробованных штаммов. С тех пор данный репликон неоднократно использовался в экспериментах со многими другими штаммами.

У *S. lividans* число копий плазмиды варьирует от 40 до 300 на клетку. Делеционные мутанты отличаются еще более высокой копийностью. Количество копий в определенной степени зависит от штамма: например, клетки *S. rimosus* дают более высокий выход плазмидной ДНК, чем *S. lividans*, что может указывать на более высокую множественность плазмиды в *S. rimosus*.

На основе pIJ101 in vitro были сконструированы уменьшенные варианты, маркированные рядом детерминант лекарственной устойчивости [12]. В первую очередь из них следует упомянуть ген устойчивости к тиострептон (клонированному из *S. azureus*), так как большинство стрептомицетов чувствительны к этому агенту. Тиострептон-устойчивая плазмиды размером 4,1 т.п.н. — производная pIJ101 — обозначена pIJ350 [12].

Более удачный вектор (pIJ702) был получен путем субклонирования в pIJ350 фрагмента ДНК, содержащего ген тирозиназы *S. antibioticus* [13]. Колонии *S. lividans*, экспрессирующие

активную тирозиназу (Mel^+), имеют черную окраску на среде, содержащей триптон и ионы меди, что позволяет проводить прямой визуальный скрининг. *pIJ702* имеет ряд уникальных рестрикционных сайтов внутри гена *mel* (рис. 2). При клонировании по данным рестриктазам внедрение чужеродных последовательностей ДНК в ген *mel* приводит к его инактивации, вследствие чего колонии трансформантов оказываются бесцветными. Таким образом, клонирование ДНК по этой схеме можно легко контролировать с помощью теста на «инсерционную инактивацию». Уникальный сайт *Bgl*II внутри гена *mel* плазмиды *pIJ702* особенно полезен в экспериментах типа «шотган». Липкие концы вектора, обработанного *Bgl*II, совместимы с липкими концами, образующимися при действии многих других рестриктаз (*Bam*HI, *Xho*II, *Bcl*I, *Sau*3A, *Mbo*I). *Sau*3A и *Mbo*I узнают тетрауклеотидные последовательности GATC, которые часто встречаются в ДНК стрептомицетов; частичный гидролиз донорной ДНК *Sau*3A или *Mbo*I дает набор случайных фрагментов, которые можно лигировать с плазмидой *pIJ702*, обработанной рестриктазой *Bgl*II.

pFJ103. Плазмида *pFJ103* разработана группой Лилли [14]. Изначально она была выделена как 20 т.п.н.-плазмида из *S. granulosus*. После введения в ее состав гена устойчивости к тиострептонину *in vitro* был получен уменьшенный вариант репликона (*pFG105*, 4,7 т.п.н.). Точных данных о копийности этой плазмиды не сообщалось, хотя легкость выделения плазмидной ДНК предполагает наличие большого числа копий. В качестве хозяев этой плазмиды могут выступать *S. ambofaciens*, *S. fradiae*, *S. aureofaciens*. Отмеченная эффективность трансформации ($4,6 \cdot 10^3/\text{мкг}$) недостаточно высока для того, чтобы считать эту плазмиду действительно удачным вектором для клонирования (см. разд. 2.3).

pUC6. Плазмида *pUC6* — криптическая плазмида размером 9,2 т.п.н. — выделена Апджоном из клеток *S. espinosus* [15]. Она представлена в клетке 30—40 копиями. В результате мутагенеза *in vitro* получен делеционный мутант *pUC6* (7,2 т.п.н.), имеющий повышенную копийность (число копий — 500—600). Это самая высокая копийность, известная на сегодня для плазмид стрептомицетов; на долю плазмиды приходится более 40% тотальной клеточной ДНК. Скрининг *pUC1061* затруднен ввиду отсутствия в этой плазмиде детерминант лекарственной устойчивости; экспрессия летального зиготиза также не характерна для *pUC1061*. Для того чтобы использовать эту плазмиду в качестве вектора, ее надо усовершенствовать путем введения селективных маркеров. Эта задача представляется относительно несложной.

2.2.2. Низкокопийные векторы

Еще не так давно низкокопийные векторы имели один существенный недостаток: сложность получения достаточно больших количеств ДНК. В настоящее время методология выделения плазмид разработана настолько хорошо, что такой проблемы практически не существует. Если стрептомицет-хозяин не обладает рестрикционной активностью (разд. 2.1.3), можно сконструировать гибрид на основе низкокопийного вектора *Streptomyces* и высококопийной плазмиды *E. coli*, что позволит выделять ДНК вектора в больших количествах из *E. coli*. Гибридная конструкция должна быть такова, чтобы при ее обработке соответствующей рестрикционной эндонуклеазой можно было изолировать фрагмент ДНК, включающий только вектор *Streptomyces*. Такой фрагмент легко можно будет отделять от последовательностей ДНК *E. coli* и прямо использовать в реакциях лигирования.

SLP1.2. Плазмида *SLP1.2* (14,5 т.п.н.) использовалась в ранних экспериментах по молекулярному клонированию в стрептомицетах [16]. Впервые она была обнаружена в экспрессирующем летальный зиготизм вариантах *S. lividans* после межвидового скрещивания с *S. coelicolor*. Позднее было показано, что эта плазмида произошла от хромосомы *S. coelicolor*, где она присутствует в интегрированной форме [17]. В автономной форме в клетках *S. lividans* плазмида *SLP1.2* представлена 4—5 копиями.

Существуют производные *SLP1.2*, содержащие одиночные селективные маркеры или комбинации генов лекарственной устойчивости [18]. Среди них наиболее универсальной можно назвать плазмиду *pIJ161* (15,7 т.п.н.), которая несет гены устойчивости к тиострептонину (*tsr*) и неомицину (*aph*) (рис. 3). Внутри гена *aph* находятся уникальные сайты узнавания рест-

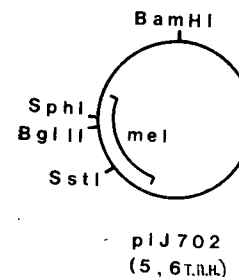


Рис. 2. Рестрикционная карта плазмиды *pIJ702*. Клонирование в уникальных сайтах *Sph*I, *Bgl*II и *Sst*I приводит к инактивации гена *mel*.

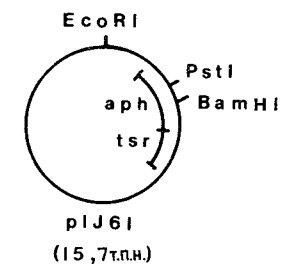


Рис. 3. Рестрикционная карта плазмиды *pIJ61*. Уникальные сайты *Pst*I и *Bam*HI локализованы внутри гена, определяющего устойчивость к неомицину.

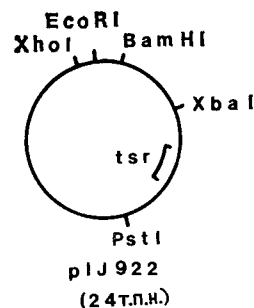


Рис. 4. Рестрикционная карта плазмиды pIJ922 [20]. Все указанные на рисунке рестрикционные сайты пригодны для клонирования.

риктаз *Bam*HI и *Pst*I. Клонирование в каждом из этих сайтов приводит к экспрессии чувствительного к неомицину фенотипа, что обеспечивает возможность удобного скрининга колоний с использованием феномена «инсерционной инактивации». Наличие сайта *Bam*HI позволяет клонировать случайные фрагменты, образующиеся в результате обработки ДНК рестриктазами *Sau*3A или *Mbo*I, как это было описано для pIJ702 (разд. 2.2.1).

Национальная исследовательская корпорация Великобритании владеет патентом на репликон SLP1.2. Однако это не должно обескураживать ученых, планирующих в своей научной работе использование данного вектора. Сложности с патентованными векторами возникают лишь тогда, когда речь идет о применении их в коммерческих целях; для научных целей все патентованные векторы предоставляются безвозмездно.

Сообщалось, что хозяйская специфичность репликонов на основе SLP1.2 ограничена [18]. Ограничения здесь могут быть вызваны несовместимостью вектора с собственными плазмидами потенциального хозяина или его рестрикционной активностью (разд. 2.1.3). Не исключено, что хозяйская специфичность базового репликона шире, чем считалось до сих пор.

SCP2. Несмотря на то что плазмида SCP2 — первая плазмида *Streptomyces*, которая стала объектом систематического изучения в плане ее физических свойств [19], широкого распространения в качестве вектора для клонирования она не имела — во-первых, из-за наличия только метиленомициновой устойчивости [1] и, во-вторых (до недавнего времени), из-за невыгодной конкуренции с SLP1.2. Плазмида SCP2 (30 т.п.н.) — природный половой фактор *S. coelicolor*; она присутствует в количестве 1–3 копий на клетку, трансмиссильна и экспрессирует летальный зиготизис.

pIJ922 (рис. 4; [20]). Это наиболее удачный вариант плазмиды SCY2. pIJ922 имеет размер 24,5 т.п.н., маркирована геном

устойчивости к тиострептонину и несет ряд уникальных сайтов рестрикции, пригодных для клонирования. Успешное клонирование в этом векторе генов метаболического пути актинородина [7], без сомнения, заставит по-новому оценить его пригодность для экспериментов такого рода.

Подобно SLP1.2, плазмиде SCP2 первоначально приписывали узкую хозяйскую специфичность. Однако, если проводить селекцию по маркерам лекарственной устойчивости (как, например, в случае pIJ922), а не на основе летального зиготизиса и использовать дефектных по системе рестрикции хозяев, вполне может оказаться, что хозяйская специфичность SCP2-репликонов, как и SLP1.2, гораздо шире, чем принято думать.

2.2.3. Фаговые векторы

Для молекулярного клонирования в стрептомицетах был разработан вектор на основе обладающего широкой хозяйской специфичностью актинофага ϕ C31 [21, 22]. Взаимоотношения этого фага с хозяином напоминают взаимоотношения фага λ с клетками *E. coli*. Фаг ϕ C31 имеет линейный геном с липкими концами; его размер — 41 т.п.н. Он может лизогенизировать клетки: состояние профага контролируется репрессором (продуктом гена *C*). Лизогенизация происходит путем рекомбинации специфических *att*-сайтов фага с соответствующими областями хромосомы. В этом случае геном ϕ C31 присутствует в хозяйском геноме в виде единственной копии.

Были сконструированы варианты ϕ C31, маркированные генами устойчивости к тиострептонину или виомицину, а также гибриды его с плазмидой pBR322. Эти последние конструкции размножают в клетках *E. coli* и полученный плазмидный материал используют для выделения фаговой ДНК. Как и в случае фага λ , существуют ограничения на упаковку ДНК в головку фага ϕ C31. Известные на сегодняшний день фаговые векторы позволяют клонировать фрагменты ДНК, не превышающие по размеру 7 т.п.н. Не вызывает сомнения, что в будущем появятся такие фаговые векторы, которые способны акцептировать более длинные вставки.

Чейтер разработал на основе ϕ C31 систему «мутационного клонирования» [23]. Используя производный от ϕ C31 фаг, имеющий делецию в области *att*-сайта, можно создать банк генов любого неохарактеризованного представителя рода *Streptomyces*. Банк скринируют на «ухудшенный» фенотип (например, неспособность продуцировать антибиотик), который возникает как следствие внедрения фага в соответствующий ген: лизогенизация происходит за счет использования фагом клонированной ДНК в качестве замены отсутствующего у него *att*-сайта. Ухудшенный фенотип (блок-мутант) появляется только

в том случае, если клонированный фрагмент содержит неполную транскрипционную единицу, соответствующую искомому гену. Этот метод призван ускорить генетический анализ неохарактеризованных штаммов.

2.3. Статистический анализ

Для того чтобы ответить на вопрос, какое количество клонов со вставками данного размера является достаточным для представления полного генома стрептомицета-донора или какое количество ДНК необходимо для выделения из банка определенного гена, придется обратиться к биномиальной теореме математической статистики. Геном стрептомицетов имеет размер 10^4 т.п.н. В табл. 1 приведены данные о количестве клонов указанного размера, которое с высокой вероятностью обеспечивает представление полного генома в банке генов стрептомицетов. Используя эту информацию, можно решить две задачи.

Определение количества вектора, необходимого для создания геномного банка. Эффективность трансформации первичным генным банком, как правило, в 100 раз ниже, чем эффективность трансформации интактным вектором. Обработка ДНК вектора фосфатазой (4.2.1) позволяет поднять долю рекомбинантных клонов лишь до 50%. Нетрудно подсчитать, сколько необходимо взять ДНК для конструирования банка.

Пример: протопласты стрептомицетов трансформируются с эффективностью $5 \cdot 10^5$ /мкг. Каково число колоний, составляющих геномный банк, если средний размер вставок — 7,5 т.п.н.?

Банк, представляющий 99,9% генома, должен насчитывать 13 810 рекомбинантных колоний (см. табл. 1). Если доля трансформантов, содержащих рекомбинантные молекулы, составляет 50%, необходимо иметь 27 620 (т. е. $2 \cdot 13 810$) трансформантов. Принимая, что трансформирующая способность генного банка

Таблица 1. Количество клонов со вставками данного размера, которое с заданной вероятностью обеспечивает получение полного банка генов *Streptomyces*

Средний размер клонированных фрагментов (т. п. н.)	Вероятность получения полного банка генов (%)			
	80	90	95	99,99
5	3218	4604	5998	18 414
7,5	2414	3453	4491	13 810
10	1609	2302	2994	9206
15	1072	1534	1998	6136
35	460	657	854	2627

составляет $5 \cdot 10^3$ /мкг (т. е. $1/100$ от $5 \cdot 10^5$), получим искомое количество вектора:

$$(2,75 \cdot 10^4) / (5 \cdot 10^3) = 5,5 \text{ мкг.}$$

Аналогичный расчет показывает, что для представления 95% генома понадобится 1,6 мкг векторной ДНК.

По возможности эксперимент всегда следует проводить с максимальным количеством ДНК, не опасаясь получить слишком много клонов, — это лучше, чем, используя минимальное количество ДНК, получить неполноценный банк из-за случайно неудавшейся трансформации.

Выяснение представительности банка генов. Отберите 30—40 колоний из предполагаемого «банка» и пересейте их на свежие чашки, содержащие антибиотик, необходимый для селекции плазмид. Из каждого клона приготовьте лизат по быстрой методике (табл. 2) и обработайте его соответствующей рестриктазой, чтобы определить длину вставочного фрагмента ДНК. На основании полученных результатов подсчитайте частоту встречаемости колоний, содержащих рекомбинантные плазмиды, и средний размер вставок, с тем чтобы определить, достаточно ли количество вставочных последовательностей клонировано в данной выборке. Хотя 40 колоний, по всей видимости, слишком малая выборка для того, чтобы делать статистически обоснованные заключения, этот метод позволяет адекватно оценить потенциальные возможности предполагаемого банка.

Таблица 2. Выделение плазмидной ДНК из колоний стрептомицетов. Метод основан на [29]

1. Перенесите колонию с чашки в пробирку для микроцентрифуги, стараясь не захватывать частиц агара.
2. Добавьте 30 мкл буфера ТЕ¹⁾, содержащего 2 мг/мл лизоцима. Суспендируйте колонию с помощью микропипетки. Инкубируйте при 30 °C в течение 15 мин.
3. Добавьте 15 мкл раствора, содержащего 0,3 М NaOH и 2% SDS. Немедленно перемешайте на встряхивателе.
4. Инкубируйте при 70 °C в течение 15 мин, затем охладите до комнатной температуры.
5. Добавьте 30 мкл смеси фенол — хлороформ²⁾. Гомогенизируйте смесь на встряхивателе в течение 10 сек, затем открутите на микроцентрифуге 2 мин, для того чтобы фазы разделились.
6. На этой стадии водную фазу можно нанести на гель. Если же планируется провести рестрикционный анализ ДНК, перенесите водную фазу в чистую пробирку. Добавьте 4 мкл 3 М ацетата натрия и 45 мкл изопропанола. Перемешайте, несколько раз перевернув пробирку, и оставьте при комнатной температуре на 5 мин. Центрифугируйте в течение 2 мин, удалите надосадочную жидкость и промойте осадок несколько раз 40%-ным изопропанолом. Растворите осадок в 10 мкл дистиллированной воды; проба готова для рестрикционного анализа.

¹⁾ ТЕ: 10 мМ трис; 1 мМ ЭДТА; pH 8,0.

²⁾ 5 г фенола; 5 г хлороформа; 5 мг гидроксихинолина.

Пример: банк генов содержит 8550 устойчивых к антибиотикам колоний. Проанализировано 40 клонов: 28 из них (т. е. 70%) содержат вставки, средняя длина которых 6,2 т.п.н.

5985 колоний из 8550 (это составляет 70%), вероятно, содержат вставки. Согласно данным, приведенным в табл. 1, для того, чтобы получить представительный геномный банк с вероятностью 95%, необходимо иметь 4837 колоний, а с вероятностью 99,99% — 14 850. Таким образом, вероятность того, что в нашем случае клонирован целый геном, больше 95%, но меньше 99,99%.

3. Культивирование штаммов

Высейте клетки *Streptomyces* на твердую среду (TSB или YEME), содержащую 1,5% агара (см. разд. 5). Инкубируйте чашку при 30 °С в течение нескольких дней, пока не произойдет споруляция. Выберите одиночную колонию, которая находится на достаточном удалении от своих соседей. С помощью стерильной микробиологической петли, смоченной в стерильной дистиллированной воде (влага способствует налипанию спор на петлю), захватите споры с поверхности колонии и затем суспендируйте их в 200 мкл стерильной воды.

Храните споры при —20 °С либо на косяке, либо в виде суспензии в 20%-ном водном растворе глицерина. Споры большинства штаммов в этих условиях остаются стабильными на протяжении нескольких лет.

Внесите споры с косяка в жидкую среду YEME или TSB, налитую в конические колбы. Для этого суспендируйте поверхностный слой агарового косяка в нескольких миллилитрах стерильной дистиллированной воды с помощью стерильной пипетки или шприца с длинной иглой. Удалите остатки мицелия из суспензии, профильтровав ее через тампон из несорбирующей хлопковой ваты (рис. 5). В случае использования глицериновой суспензии споры осадите в настольной центрифуге (3000 g, 10 мин), после чего ресуспендируйте в стерильной воде (глицерин может ингибировать прорастание спор, поэтому его лучше удалить). Споры некоторых штаммов прорастают более активно, если их подвергнуть «тепловому шоку». С этой целью колбу с засеянной средой, перед тем как поместить на качалку на 30 °С, инкубируют в течение 10 мин при 45—50 °С.

Конические колбы энергично качают (300 об/мин в шейкере) для обеспечения хорошей аэрации. Большинство штаммов хорошо растет при 30 °С, однако есть и такие, например *S. clavuligerus*, которые очень плохо растут при 30 °С и хорошо — при 26 °С. Для выращивания 200 мл культуры из спор обычно требуется два дня.

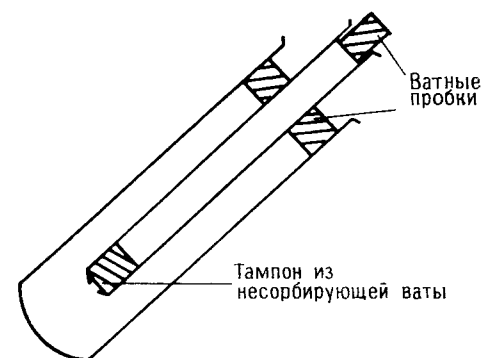


Рис. 5. Приспособление для удаления остатков мицелия из суспензий спор и протопластов. В дне пробирки диаметром 1,25 см проделано отверстие с помощью стальной иглы, нагретой до красного каления. Это отверстие закрыто тампоном из несорбирующей ваты; нижняя часть пробирки вставлена в другую пробирку диаметром 2,5 см и удерживается в таком положении ватной пробкой. Суспензию спор (или протопластов) наливают во внутреннюю пробирку и фильтруют через слой ваты, собирая профильтрованную суспензию в наружную пробирку.

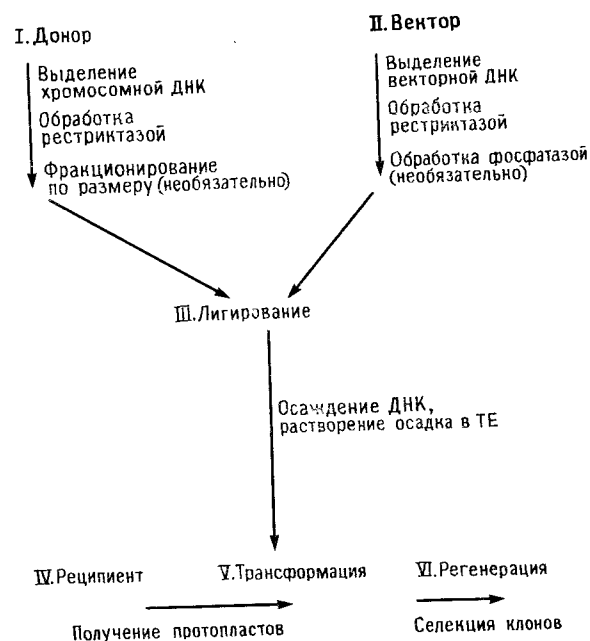
В некоторых лабораториях серьезную проблему представляет загрязнение грибами. Добавление циклогексимида (10 мкг/мл) к жидким и твердым средам ингибирует рост грибов, не влияя на развитие стрептомицетов. Среде TSB в целом следует отдать предпочтение, потому что ее проще готовить. Центрифугировать препараты в TSB легче — она не столь вязкая, как YEME, которая содержит большое количество сахарозы. Тем не менее некоторые штаммы не очень хорошо растут в TSB, и для них лучше использовать среду YEME.

4. Практическое руководство по клонированию ДНК

4.1. Краткий обзор процедуры клонирования ДНК в стрептомицетах

На рис. 6 показаны этапы получения банка клонов геномной ДНК стрептомицетов.

1. Выделяют хромосомную ДНК из клеток донора (см. разд. 4.2.1) и проводят ее частичный гидролиз какой-нибудь мелкощепящей рестриктазой, например *Sau3A*. Фракционируют гидролизат так, чтобы средняя длина предназначенных для клонирования фрагментов ДНК укладывалась в заранее определенные пределы. Этот этап важен при клонировании в лямбдоидных и космидных векторах и может оказаться весьма полезным в плане статистического анализа обычных плазмидных библиотек генов. Этот подход обсуждался в гл. 1.

Рис. 6. Получение банка клонов геномной ДНК *Streptomyces*.

2. Выделяют ДНК-вектор (см. разд. 4.2.2), обрабатывают ее рестрикционной эндонуклеазой, которая дает «липкие концы», совместимые с липкими концами, присутствующими в хромосомной ДНК. Затем обрабатывают фосфатазой для того, чтобы предотвратить циклизацию вектора без вставок в процессе лигирования (см. разд. 4.2.4).

3. Проводят реакцию лигирования вектора и фрагментов донорной ДНК (см. разд. 4.3).

Эти три стадии — общие для процедур получения любого геномного банка. Однако в случае стрептомицетов ДНК вводится не в нативные реципиентные клетки, а в протопласты, и этот этап сильно отличается от трансформации *E. coli*.

4. Обрабатывают клетки лизоцимом для удаления клеточной стенки; протопласты сохраняют в среде с подходящими осмотическими свойствами (см. разд. 4.4).

5. Смешивают ДНК с протопластами и добавляют полиэтиленгликоль (PEG). Пока еще малопонятным образом ДНК проникает внутрь клеток, т. е. они трансформируются (см. разд. 4.5).

6. Регенерируют протопласты (трансформированные и не трансформированные) на богатой среде в неселективных усло-

виях (т. е. стимулируют у них регенерацию клеточной стенки). Затем проводят селекцию трансформированных клеток (см. разд. 4.6).

4.2. Выделение ДНК

Получение хороших препаратов высокомолекулярной ДНК, свободной от РНК и белков, — обязательное условие любого эксперимента по молекулярному клонированию. ДНК должна легко гидролизироваться ферментами рестрикции. Для создания генных банков стрептомицетов в большинстве случаев требуются большие количества ДНК (см. разд. 2.3). Следовательно, если препарат ДНК недостаточно чист и для его гидролиза требуется большой избыток рестриктазы, эксперимент может оказаться слишком дорогостоящим. Кроме того, большинство препаратов рестрикционных ферментов содержат следовые количества экзонуклеаз; добавляя к ДНК избыток рестриктазы, мы неизбежно увеличиваем количество вносимой экзонуклеазной активности. Экзонуклеазы повреждают липкие концы фрагментов ДНК, делая их малопригодными для клонирования. Одним словом, стоит постараться и подойти к процедуре выделения ДНК со всей возможной тщательностью.

4.2.1. Суммарная геномная ДНК

Ниже приведены три метода выделения суммарной ДНК из клеток стрептомицетов (табл. 3). Каждый из них может быть рекомендован к применению в определенных, конкретных условиях эксперимента.

Таблица 3. Выделение суммарной ДНК из стрептомицетов (метод 1)

1. Внесите в 200 мл среды TSB или YEME (в зависимости от штамма — см. текст) 1 мл концентрированной суспензии спор. Инкубируйте на качалке при 30 °C.

2. Осадите клетки, когда культура достигнет заметной плотности (обычно для этого требуются 2 дня), путем центрифугирования в 250 мл стакане в роторе Бескман JA14 (или эквивалентном) при 12 000 об/мин (22 100 g) в течение 10 мин.

3. Ресуспендируйте осадок клеток в 10 мл буфера TE, добавьте 10 мг лизоцима и инкубируйте при 30 °C в течение 15 мин.

4. Добавьте 1 мл 20%-ного раствора SDS и аккуратно мешайте пипеткой 15 с. Раствор станет вязким. Немедленно добавьте 10 мл фенола, насыщенного TE, и 1,5 мл 5 M NaCl. Осторожно переверните пробирку и верните в исходное положение; повторяйте эту процедуру при комнатной температуре в течение 20 мин.

5. Перенесите смесь в 50 мл полипропиленовую центрифужную пробирку с крышкой и центрифугируйте при 1500 об/мин в течение 10 мин в бакет-роторе в настольной или среднескоростной центрифуге для разделения фаз.

Продолжение

6. Отберите вязкий верхний слой с помощью широконосой пипетки и перенесите в чистую пробирку. Не опускайте кончик пипетки близко к интерфазе.

7. Добавьте равный объем хлороформа. Перемешайте содержимое пробирки, аккуратно переворачивая ее в течение 10 мин. Центрифугируйте при 1500 об/мин в течение 10 мин в бакет-роторе (см. этап 5).

8. Отберите вязкий верхний слой и повторите этап 7.

9. Отберите вязкий слой и перенесите в стерильный стакан на 100 мл. Аккуратно прилейте равный объем изопропанола, так чтобы образовались две фазы. ДНК, преципитировавшую в интерфазе, намотайте на пастеровскую пипетку.

10. Растворите ДНК в минимальном объеме ТЕ. Для того чтобы полностью растворить ДНК, можно нагреть раствор до 65 °С.

11. Добавьте РНКазу до конечной концентрации 20 мкг/мл. Инкубируйте при 50 °С в течение 1 ч.

12. Добавьте протеиназу К (свежеприготовленный раствор) до конечной концентрации 100 мкг/мл, NaCl и SDS — до концентрации соответственно 100 мМ и 0,4%. Инкубируйте при 37 °С в течение 1 ч.

13. Добавьте равный объем фенола, насыщенного ТЕ, и повторите стадии 5—10.

14. Определите концентрацию и чистоту ДНК по ее спектру поглощения в интервале длин волн 230—280 нм.

1. Первый метод (табл. 3) подходит для большинства штаммов. Он включает процедуру «наматывания» высокомолекулярной ДНК из раствора, что обеспечивает ее эффективную очистку. Успех всей процедуры зависит от полноты лизиса клеток додецилсульфатом натрия (SDS) на стадии 4. Перемешивать следует тщательно, но нерезко, чтобы избежать фрагментирования высокомолекулярной ДНК. Фенол надо добавлять немедленно, чтобы предотвратить действие нуклеаз, которые высвобождаются в момент лизиса клеток.

Обычно этим методом получают до нескольких миллиграммов ДНК, что вполне достаточно для проведения многих экспериментов. Хотя эта процедура может показаться скучноватой, она обеспечивает получение высокомолекулярной ДНК (>100 т.п.н.) отличного качества и, безусловно, оправдывает затраченное время и усилия.

2. Ускоренный метод выделения тотальной ДНК (табл. 4) включает лизис мицелия SDS и очистку ДНК путем центрифугирования в градиенте плотности CsCl. Преимущество этого метода — относительная простота, но, к сожалению, применять его можно не для всех штаммов. Случается, что ДНК после центрифугирования оказывается частично деградированной — вероятно, из-за действия ДНКаз, которые высвобождаются на стадии 4. Для того чтобы инактивировать нуклеазы, на этой стадии можно добавить фенол (см. этапы 4—8, табл. 3), но это увеличит количество операций. Если экспериментатор все же решит добавлять фенол, ему стоит подумать, какой методике —

Таблица 4. Ускоренная процедура выделения суммарной ДНК стрептомицетов (метод II)

1. Внесите в 25 мл среды TSB или YEME (в зависимости от штамма — см. текст) 0,1 мл концентрированной суспензии спор. Инкубируйте на качалке при 30 °С.

2. Осадите клетки, когда культура достигнет заметной плотности (обычно для этого требуется 2 дня), путем центрифугирования в 50 мл стакане в роторе Beckman JA20 (или эквивалентном) при 10 000 об/мин (12 000 g) в течение 10 мин.

3. Ресуспендируйте осадок клеток в 25 мл буфера TE, добавьте 25 мг лизоцима и инкубируйте при 30 °С в течение 15 мин.

4. Добавьте 1,25 мл 20%-ного раствора SDS. Раствор станет вязким. Добавьте 26,25 г CsCl, аккуратно перемешивая смесь, и 1 мл этидиумбромид (10 мг/мл в ТЕ). Конечная плотность раствора должна быть 1,58 г/мл.

5. Перелейте раствор в центрифужную пробирку для ротора Beckman VTi50 (или эквивалентного). Заполните пробирку доверху подходящим раствором CsCl или минеральным маслом (см. табл. 6, этап 8) и закройте крышкой, руководствуясь инструкцией.

6. Проведите равновесное центрифугирование. Для ротора VTi50 рекомендуемый режим: 16 ч при 45 000 об/мин, 20 °С.

7. Визуализируйте ДНК длинноволновым УФ светом. Отберите полосу, соответствующую хромосомной ДНК, с помощью шприца и широкой иглы, проколов боковую стенку пробирки. Разведите ДНК в три раза буфером ТЕ и осадите этанолом (2,2 объема).

8. После 1-часового выдерживания при -20 °С соберите осадок ДНК центрифугированием. Подсушите осадок на воздухе и растворите ДНК в минимальном объеме ТЕ.

табл. 3 или табл. 4 — следовать дальше. В целом же, это дело вкуса. Выход ДНК в среднем составляет приблизительно 100 мкг на 25 мл культуры. Полученную этим методом ДНК лучше всего использовать для блот-гибридизации по Саузерну, где незначительная деградация материала не играет существенной роли.

3. Некоторые штаммы дают низкий выход ДНК, которая к тому же оказывается полностью деградированной, если использовать любой из описанных выше методов. В этом случае может помочь механическое разрушение мицелия в жидком азоте с последующей экстракцией саркозилем (табл. 5). После обработки РНКазой и протеиназой К лизат наслаивают на градиент плотности CsCl (не содержащий этидиумбромид, плотность 1,7 г/мл) для дальнейшей очистки. Этот метод позволяет получать высокомолекулярную ДНК хорошего качества, однако в весьма небольших количествах (обычно менее 50 мкг). Проблему низкого выхода можно преодолеть, нарастив несколько литров культуры и пропорционально увеличив количественные параметры, приведенные в табл. 5 (в частности, использовать все восемь пробирок в роторе для ультрацентрифугирования). Таким образом, этот метод можно рассматривать как хороший запасной вариант на тот случай, если первый метод не срабо-

Таблица 5. Экстракция суммарной ДНК стрептомицетов из мицелия, разрушенного с помощью стеклянных шариков (метод III)

1. Внесите в 200 мл среды TSB или YEME (в зависимости от штамма — см. текст) 1 мл концентрированной суспензии спор. Инкубируйте на качалке при 30 °C.
2. Осадите клетки, когда культура достигнет заметной плотности (обычно для этого требуются 2 дня) путем центрифугирования в 250 мл стакане в роторе Бескмап JA14 (или эквивалентном) при 12 000 об/мин (22 100 g) в течение 10 мин.
3. Ресуспенсируйте осадок в 0,3 М сахарозе и центрифугируйте как описано в п. 2.
4. Поместите 2 г мелких стеклянных шариков (100 меш) в ступку и заполните ее жидким азотом. Шпателем снимите осадок мицелия со стенок центрифужного стакана и поместите его в ступку. Растирайте смесь пестиком, добавляя по мере надобности жидкий азот, чтобы смесь оставалась замерзшей.
5. Продолжайте растирать до тех пор, пока не получится тонкая пудра. Шпателем всыпьте эту пудру в 10 мл буфера SNET¹⁾ и центрифугируйте в роторе Бескмап JA20 (или эквивалентном) при 10 000 об/мин (12 100 g), 4 °C в течение 20 мин.
6. Соберите надосадочную жидкость и измерьте ее объем. Добавьте РНКазу до конечной концентрации 100 мкг/мл и инкубируйте при 50 °C 30 мин. Добавьте протеиназу К до конечной концентрации 50 мкг/мл и инкубируйте при 37 °C в течение 30 мин.
7. Добавьте равный объем фенола, насыщенного ТЕ. Нерезко переверните пробирку и верните в исходное положение. Повторяйте эту процедуру при комнатной температуре в течение 10 мин. Центрифугируйте, отберите водную фазу, добавьте равный объем хлороформа и нерезко переверните пробирку при комнатной температуре в течение 10 мин.
8. Центрифугируйте, отберите водную фазу и измерьте ее объем. Добавьте CsCl из расчета 1 г на 1 мл жидкости и аккуратно перемешайте, чтобы соль полностью растворилась. Перенесите раствор в центрифужную пробирку и заполните ее либо раствором CsCl (20 г CsCl+20 мл ТЕ), либо минеральным маслом. Плотность раствора должна быть приблизительно 1,72 г/мл.
(Примечание: этот раствор не содержит этидиумбромид.)
9. Проведите равновесное центрифугирование в роторе VTi50 (40 000 об/мин, 16 ч, 20 °C).
10. Срежьте верхушку пробирки нагретым скальпелем или лезвием бритвы. Используя 100 мкл капилляр, соединенный с тефлоновым микрошлангом, откапайте содержимое пробирки на фракции по 1 мл в пробирки для микроцентрифуги.
11. Определите, какие фракции содержат ДНК. Для этого нанесите по 5 мкл раствора из каждой фракции на пластину 1%-ной агарозы, содержащей 1 мкг/мл этидиумбромид.
12. Диализуйте фракции, содержащие ДНК, против 100 объемов буфера ТЕ; сделайте две смены буфера. Добавьте 0,1 объема 5 М NaCl и 2,2 объема этанола. Перемешайте и охладите до -20 °C. Осадите ДНК центрифугированием, удалите надосадочную жидкость, а осадок подсушите на воздухе.
13. Растворите осадок в ТЕ и определите концентрацию ДНК и чистоту препарата, сняв спектр поглощения в интервале длин волн 230—280 нм.

¹⁾ SNET: 2% саркозила; 50 мМ ЭДТА; 50 мМ NaCl; 50 мМ трис-HCl pH 7,6.

Таблица 6. Выделение ковалентно замкнутой кольцевой ДНК из стрептомицетов

1. Внесите в 200 мл среды TSB или YEME (в зависимости от штамма — см. текст), содержащей антибиотик для селекции клеток с плазмидами, 1 мл концентрированной суспензии спор. Инкубируйте на качалке при 30 °C.
2. Осадите клетки, когда культура достигнет заметной плотности (обычно для этого требуются 2 дня), путем центрифугирования в 250 мл стакане в роторе Бескмап JA14 (или эквивалентном) при 12 000 об/мин (22 100 g) в течение 10 мин. Культуры, выращенные в среде YEME, перед центрифугированием рекомендуется разбавить вдвое стерильной водой.
3. Ресуспенсируйте осадок в 25 мл буфера ТЕ. Добавьте 5 мл 0,25 М ЭДТА и 75 мг лизоцима. Инкубируйте при 30 °C в течение 20 мин.
4. Добавьте 25 мл ТЕ; 15 мл 0,25 М ЭДТА и 4,2 мл 20%-ного SDS. Немедленно перемешайте (нерезко) стеклянной палочкой. Клетки лизируются, и раствор становится вязким. Добавьте 16,8 мл 5 М NaCl и аккуратно перемешайте стеклянной палочкой. Инкубируйте при 4 °C в течение 4 ч.
5. Центрифугируйте смесь в роторе Бескмап JA14 (или эквивалентном) при 14 000 об/мин (31 000 g) 4 °C в течение 30 мин. Если при этом не сформировался плотный осадок, центрифугируйте в том же режиме еще раз. Отберите надосадочную жидкость в стерильный мерный цилиндр. Добавьте 0,5 объема стерильного 30%-ного раствора PEG 6000, перемешайте, закрыв и перевернув цилиндр, перелейте содержимое в 250 мл центрифужный стакан и оставьте при 4 °C на ночь.
6. Центрифугируйте при 5000 об/мин (3840 g), 4 °C в течение 5 мин. Осторожно удалите надосадочную жидкость.
7. Ресуспенсируйте осадок в 13 мл ТЕ. Добавьте 13 г CsCl и мягко перемешайте, чтобы вся соль растворилась. Добавьте 500 мкл этидиумбромид (10 мг/мл в ТЕ). Плотность раствора должна составлять 1,58 г/мл.
8. Для центрифугирования в роторе Бескмап VTi50 доведите объем раствора до 38 мл, добавив подходящий раствор CsCl¹⁾, и заполните центрифужную пробирку. Закройте пробирку, руководствуясь инструкцией.
9. Проведите равновесное центрифугирование. Для ротора VTi рекомендуемый режим 15 ч при 45 000 об/мин, 20 °C.
10. Отберите нижнюю полосу, соответствующую плазмидной ДНК, с помощью шприца и широкой иглы. Стадии 11 и 12 не являются обязательными и включаются в методику только в том случае, если плазмида загрязнена хромосомной ДНК. Если же загрязнения нет, переходите к этапу 13.
11. Перенесите отобранную плазмидную фракцию в пробирку для ротора Бескмап VTi65. Заполните пробирку доверху раствором CsCl¹⁾. Центрифугируйте до достижения равновесия (55 000 об/мин, 4 ч, 20 °C).
12. Визуализируйте ДНК путем облучения длинноволновым УФ светом. Отберите полосу, соответствующую плазмидной ДНК, с помощью шприца и широкой иглы, проколов боковую стенку пробирки.
13. Удалите из раствора плазмидной ДНК этидиумбромид, экстрагируя его водонасыщенным бутанолом. Повторяйте экстракцию до тех пор, пока бутанольная фаза не перестанет флуоресцировать в длинноволновом УФ свете.
14. Перенесите водную фазу в диализный мешок и диализуйте против 100 объемов буфера ТЕ в течение 16 ч при 4 °C. Буфер следует заменять по меньшей мере дважды.
15. Отберите раствор ДНК из диализного мешка и осадите ДНК этанолом, как описано в пп. 12 и 13, табл. 4. Растворите осадок ДНК в дистиллированной воде; объем раствора можно довести до 500 мкл.

¹⁾ Раствор для заполнения центрифужных пробирок: 52 г CsCl; 52 мл ТЕ; 2 мл раствора этидиумбромид (10 мг/мл).

тает. Он также эффективен при работе с организмами, родственными *Streptomyces*, например проактиномицетами, для которых первый метод не дает хороших результатов.

4.2.2. Плазмидная ДНК

В литературе описано несколько методов выделения плазмидной ДНК: лизис щелочью в присутствии SDS, лизис тритоном и т. д. Мы обычно используем метод (табл. 6), основанный на ранних методических разработках по выделению и очистке SCP2 [24]. Хотя вся процедура выделения занимает два дня, она включает довольно простые операции и дает легко воспроизводимые результаты. Выход плазмидной ДНК составляет приблизительно 2 мг для высококопийных векторов типа pIJ101, что вполне пригодно для получения препаративных количеств вектора.

Мицелии лизируют в растворе SDS (см. этап 4, табл. 6). Полный лизис на этой стадии — залог высокого выхода плазмидной ДНК. Лизаты некоторых штаммов содержат столь большие количества РНК, что ее осадок на стенке центрифужной пробирки при кручении в вертикальном роторе может загрязнить полосу плазмидной ДНК. Чтобы этого избежать, добавляют РНКазу (100 мкг/мл, 50 °C, 30 мин) к надосадочной жидкости на стадии 5.

Быстрый скрининг клонов целесообразно проводить, выделяя плазмидную ДНК непосредственно из колоний [29].

4.2.3. Фаговая ДНК

Наша лаборатория не имеет приоритета на выделение ДНК актинофагов, поэтому было бы неуместно приводить здесь соответствующие методики. Заметим только, что в своей работе мы с успехом использовали фаговую ДНК, предоставленную Чейтером; эта ДНК была выделена по методике, описанной им с сотрудниками [25]. ДНК актинофагов выделять несколько сложнее, чем плазмидную ДНК актиномицетов, аналогично тому как ДНК фага лямбда выделять труднее, чем плазмидную ДНК из клеток *E. coli*.

4.2.4. Обработка ДНК-вектора фосфатазой

Для увеличения числа клонов, содержащих вставки, в процессе приготовления любого банка генов рекомендуется провести фосфатазную обработку вектора, чтобы предотвратить ковалентное соединение его концов друг с другом (без вставки) в ходе реакции лигирования. Этот подход используют как для плазмидных, так и для фаговых векторов. Дефосфорилирование

векторов осуществляют с помощью фосфатазы из тонкого кишечника телят (Boehringer).

ДНК вектора, обработанную рестриктазой, осаждают этанолом, высушивают в вакууме и растворяют в 0,1 М глицине (рН 10,2) до концентрации 100 нг/мкл. Добавляют щелочную фосфатазу (0,5 ед/мкг ДНК) и инкубируют при 37 °C в течение 60 мин. Реакцию останавливают, добавляя равный объем фенола; смесь встряхивают и центрифугируют в микроцентрифуге. Водную фазу несколько раз экстрагируют хлороформом, затем переносят в новую микроцентрифужную пробирку и осаждают ДНК этанолом, чтобы сконцентрировать для последующего лигирования.

Высокое значение рН инкубационной смеси близко к оптимальному для данного фермента, поэтому в реакцию добавляют минимальное количество фосфатазы. Присутствие в смеси небольшого количества $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, который содержится в коммерческих препаратах фосфатазы, не оказывает влияния на эффективность лигирования. Щелочная фосфатаза должна иметь квалификацию «для молекулярно-биологических исследований» («Molecular biology grade», Boehringer). Такой препарат хорошо работает в буфере для рестриктазы и не содержит $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

После трансформации протопласты стрептомицетов регенерируют довольно долго, поэтому перед тем, как приступать к получению банка, стоит проверить полноту дефосфорилирования вектора и одновременно его способность лигироваться. Обычно проверяют только первый из указанных параметров, используя в качестве критерия оценки неспособность вектора лигироваться по типу «сам на себя». Однако неэффективность лигирования в этом случае может объясняться также повреждением «липких» концов вектора или присутствием в препарате ингибитора лигазы (например, фенола). Поэтому здесь необходим дополнительный позитивный контроль, показывающий, что дефосфорилированный вектор сохранил способность лигироваться со вставкой. Роль вставки в таком проверочном эксперименте может выполнить другая плаزمид. Рис. 7 демонстрирует результаты подобного теста. Плазмиду размером 12 т.п.н., обработанную BglII, лигировали со вставкой — плазмидой pUC19, разрезанной BamHI (2,7 т.п.н.). Вначале необходимо удостовериться, что разрезанный вектор до обработки фосфатазой может лигироваться «сам на себя» (дорожка 2), т. е. рестрикционный фермент оставляет интактные липкие концы, способные ковалентно воссоединяться в реакции лигирования. После фосфатазной обработки вектор теряет способность ковалентно замыкаться сам на себя (дорожка 4). Однако после добавления «ДНК-вставки» (дорожка 5) и затем лигазы (дорожка 6) происходит эффективное лигирование компонентов —

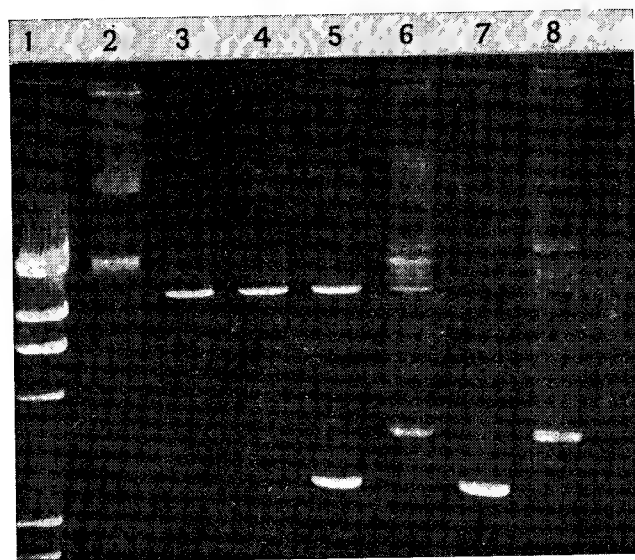


Рис. 7. Проверка эффективности фосфатазной обработки вектора. Дорожка 1 — ДНК фага λ , обработанная *Hind*III; 2 — векторная ДНК (12 т.п.н.), лигированная без предварительной обработки фосфатазой; 3 — векторная ДНК, обработанная фосфатазой; 4 — векторная ДНК, лигированная после фосфатазной обработки; 5 — обработанная фосфатазой векторная ДНК+вставка (2,7 т.п.н.) до лигирования; 6 — обработанная фосфатазой векторная ДНК+вставка после лигирования; 7 — ДНК-вставка до лигирования; 8 — ДНК-вставка после лигирования «на себя».

это можно проследить по исчезновению полосы, соответствующей ДНК вектора в дорожке 6 (сравните с дорожкой 5). Контролем служит также поведение собственно ДНК-вставки (дорожка 7) в реакции лигирования (дорожка 8). Если в дорожке 8 мы наблюдаем нормальную картину лигирования, а в дорожке 6 — нет, это означает, что препарат вектора содержит ингибитор лигазы. Если же в дорожке 6 вставка залигировалась нормально, а вектор — нет (полоса векторной ДНК видна так же хорошо, как в дорожке 5), скорее всего, повреждены его липкие концы. В этом случае лучше всего приготовить новый вектор.

4.3. Лигирование ДНК

Для создания геной библиотеки ДНК лигируют при общей концентрации 20 мкг/мл; молярное соотношение вставка — вектор составляет обычно 2 : 1. Реакционная смесь содержит 66 мМ трис-HCl (pH 7,6); 6 мМ $MgCl_2$; 10 мМ ДТТ и 1 мМ АТР. Раствор АТР при приготовлении следует нейтрализовать NaOH

до pH 7,6. Нагрейте лигазную смесь до 65°C, выдержите при этой температуре 10 мин и охладите на льду, перед тем как добавлять лигазу. Эта процедура необходима для того, чтобы разрушить внутримолекулярные водородные связи, которые образовались в процессе приготовления препарата благодаря наличию липких концов. Инкубируйте смесь при 14°C в течение ночи, затем осадите ДНК этанолом и для трансформации растворите в буфере TE. К примеру, имея 5,5 мкг ДНК pIJ702 (5,6 т.п.н.) и вставки со средним размером 7,5 т.п.н., мы достигнем двукратного молярного избытка вставочной ДНК, взяв ее в количестве

$$2 \cdot 5,5(7,5/5,6) = 14,7 \text{ мкг.}$$

При этом общее количество ДНК в реакции лигирования будет равно 20,2 мкг. Следовательно, объем реакционной смеси должен составлять 1,01 мл.

4.4. Получение протопластов

Описание процедуры приведено в табл. 7. Клетки выращивают в присутствии глицина, который делает мицелий более восприимчивым к действию лизоцима. (Отметим, что глицин также замедляет рост мицелия.) Протопласты можно получать

Таблица 7. Получение протопластов стрептомицетов

1. Внесите в 25 мл среды TSB или YEME (в зависимости от штамма см. текст) 0,1 мл суспензии спор. Добавьте $MgCl_2$ и глицин до конечной концентрации 5 мМ и 0,5% соответственно. Инкубируйте на качалке при 30°C в течение 2 сут.
2. Соберите мицелий центрифугированием в роторе Вексман JA20 (или эквивалентном) при 5000 об/мин (3000 g), 20°C в течение 10 мин. Ресuspendируйте осадок в 10 мл 0,3 М сахарозы, чтобы промыть клетки, и снова центрифугируйте при 5000 об/мин в течение 10 мин.
3. Ресuspendируйте 0,3—1,0 г осажденных клеток в 4 мл свежеприготовленного раствора лизоцима¹⁾ (1 мг/мл). Инкубируйте в течение 30 мин при 37°C. Поддерживайте мицелий во взвешенном состоянии, постоянно помешивая суспензию стеклянной палочкой.
4. Добавьте 5 мл среды Р²⁾ и профильтруйте суспензию через несorbирующую хлопковую вату (рис. 5). Центрифугируйте 10 мин при 5000 об/мин.
5. Мягко ресuspendируйте осадок в 5 мл среды Р и повторите центрифугирование.
6. Повторите этап 5.
7. Мягко ресuspendируйте осадок в 2 мл среды Р. Расфасуйте суспензию порциями по 100 мкл и заморозьте при -20°C. Хорошие препараты дают $5 \cdot 10^7$ протопластов.

¹⁾ В раствор лизоцима можно также добавить ахромопептидазу в концентрации 1 мг/мл; подробности см. в тексте.

²⁾ Состав сред приведен в разд. 5.

из большинства штаммов, нарастив их до относительно высокой плотности, — т. е. на стадии позднего логарифмического роста. Однако некоторые штаммы обнаруживают более высокую эффективность трансформации, если протопласты были получены на ранней и средней фазах логарифмического роста культуры. 0,5% концентрации глицина в среде культивирования, по-видимому, является оптимальной для большинства штаммов. При меньшем содержании глицина в среде мицелий остается относительно устойчивым к действию лизоцима, а большие количества существенно замедляют рост клеток.

Центрифугировать мицелий следует осторожно, на низких скоростях, поскольку мицелиальный осадок, полученный при больших центробежных ускорениях (более 10 000 g), довольно трудно ресуспендировать до гомогенного состояния. Образующиеся при этом сгустки снижают выход протопластов.

Во время инкубации с лизоцимом формирование протопластов можно наблюдать под микроскопом, используя объектив $\times 40$. Под фазово-контрастным микроскопом протопласты имеют вид маленьких сфер, которые лизируются при добавлении к препарату капли воды. Мицелии намного крупнее несферической формы и, естественно, не лизируются. Длительная инкубация с лизоцимом снижает эффективность трансформации полученных протопластов. В случае неохарактеризованных штаммов целесообразно через определенные промежутки времени инкубации отбирать пробы, оценивать под микроскопом количество протопластов и проверять эффективность их трансформации. Анализируя состояние препарата под микроскопом, исследователь довольно скоро вырабатывает в себе «шестое чувство», подсказывающее ему оптимальное время окончания инкубации с лизоцимом. Некоторые штаммы «склонны» очень быстро образовывать сгустки протопластов. Чтобы этого избежать, следует снизить концентрацию лизоцима до 0,2–0,3 мг/мл.

Некоторые штаммы формируют протопласты с трудом. В этих случаях может помочь добавление ахромопептидазы, облегчающей этот процесс [26]. Ахромопептидазу обычно добавляют в раствор лизоцима в той же концентрации — 1 мг/мл. Варьирование соотношения лизоцима и ахромопептидазы не дает ощутимого эффекта.

Протопласты *Streptomyces* хорошо хранятся при -20°C . После годичного хранения не обнаруживается заметного снижения их трансформационной компетентности. Повторные циклы замораживания-оттаивания существенно увеличивают время регенерации протопластов, поэтому лучше их избегать. Кроме того, в этой ситуации трудно определить момент для наслаивания антибиотиков (см. раздел 4.7). Рекомендуется замораживать протопласты небольшими порциями и размораживать

каждую порцию целиком, один раз — непосредственно перед трансформацией. Аликвота объемом 100 мкл может дать $5 \cdot 10^7$ регенерировавших протопластов.

4.4.1. Анализ причин низкого выхода протопластов при работе с неохарактеризованным штаммом

1. Проверьте стеклянную посуду — не осталось ли на ней следовых количеств детергентов, к которым протопласты очень чувствительны. Если есть подозрение на стекло, работайте с пластиковыми пробирками или промойте стеклянную посуду азотной кислотой.

2. Варьируйте время культивирования до осаждения мицелия.

3. Варьируйте время инкубации с лизоцимом и его концентрацию, контролируя процесс формирования протопластов под микроскопом.

4. Используйте раствор лизоцима, содержащий ахромопептидазу.

4.5. Трансформация

ДНК вводится в протопласты в присутствии PEG (табл. 8). Средняя мол. масса PEG, по-видимому, не влияет на эффективность трансформации. В нашей лаборатории чаще всего используют PEG 1500 (BDH), хотя PEG 6000 работает также хорошо. Мы уже упоминали, что коммерческие препараты разных фирм-производителей и даже разные партии одной и той же фирмы обычно содержат следовые количества посторонних веществ, которые могут оказывать как положительное, так и отрицатель-

Таблица 8. Трансформация протопластов стрептомицетов

1. Приготовьте свежий 25%-ный раствор полиэтиленгликоля (PEG 1500) в «Т-смеси»¹⁾ [5]. Удобно приготовить навески по 1 г PEG 1500 в стеклянных флакончиках и после автоклавирования (121°C , 10 мин) хранить их при комнатной температуре. По мере надобности флаконы нагревают до 65°C , чтобы расплавить PEG, и добавляют в каждый по 3 мл стерильной «Т-смеси» — получается 25%-ный раствор.

2. Замороженным протопластам (методика в табл. 7) дайте оттаять на льду. Мягко перемешайте суспензию наконечником микропипетки, чтобы она стала гомогенной.

3. Добавьте ДНК в объеме, не превышающем 10 мкл. Оставьте на 10 с во льду.

4. Добавьте 0,5 мл 25%-ного раствора PEG 1500 и несколько раз пипетируйте, чтобы перемешать смесь. Оставьте на 1 мин во льду.

5. Добавьте 2 мл среды Р [5] и пипетируйте до полного перемешивания суспензии. Вылейте раствор на регенерационную среду. Если необходимо, предварительно сделайте разведения суспензии средой Р.

¹⁾ «Т-смесь» и другие среды описаны в разд. 5.

ное влияние на эффективность трансформации протопластов. Наш опыт свидетельствует о стабильности и хорошем качестве препаратов полиэтиленгликоля фирмы BDH.

Мы никогда не добавляли более 1 мкг ДНК к 100 мкл порции протопластов. Если для создания банка генов необходимы большие количества ДНК, размораживаются несколько фасовок протопластов и смешиваются. В этом случае количественные параметры процедуры трансформации (табл. 7) пропорционально увеличиваются. Например, для 5 мкг ДНК мы берем 5 фасовок протопластов; 2,5 мл 25%-ного раствора PEG и 10 мл среды Р.

После разбавления трансформационной смеси средой Р на стадии 5 концентрация PEG составляет 4—5%, что вполне приемлемо для высева протопластов. Если содержание PEG в среде слишком велико, смесь остается очень вязкой и распределяется на регенерационных чашках неравномерно. Если необходимо, можно удалить PEG путем центрифугирования трансформационной смеси при 3000g в течение 10 мин и затем аккуратно ресуспендировать осадок в свежей среде Р. В приведенном выше примере для 5 мкг ДНК объем суспензии трансформированных протопластов будет составлять 13 мл, что потребует для высева 130 чашек! Центрифугирование смеси и последующее ресуспендирование осадка в малом объеме среды Р позволяют обойтись гораздо меньшим числом чашек.

Для некоторых штаммов понижение содержания ионов Ca^{2+} в трансформационной смеси («Т-смесь») со 100 мМ до 10 мМ в 5—10 раз повышает эффективность трансформации.

Ранее сообщалось [27] о том, что включение плазмидной ДНК в липосомы [28] повышает ее способность трансформировать протопласты. Однако в нашей лаборатории воспроизвести эти результаты не удалось. Добавление пустых липосом к ДНК перед трансформацией протопластов не влияло на эффективность этой процедуры. В то же время было показано, что пустые липосомы действительно стимулируют трансформацию фаговой ДНК. Как бы то ни было, для большинства плазмидных векторов эффективность трансформации сейчас достаточно высока, и технологические сложности, связанные с получением липосом, становятся препятствием для их применения в плазмидной трансформации.

4.6. Регенерация

Протопласты стрептомицетов регенерируют на твердой среде. Пока еще не разработан метод регенерации клеточных стенок у протопластов в жидкой культуре.

Регенерационная среда для протопластов стрептомицетов (R2) изначально предназначалась для экспериментов по слия-

нию протопластов. Источником углерода в этой среде является глюкоза; среда R2 богата азотом, содержит большие количества ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} и характеризуется высокой концентрацией сахарозы, которая выполняет роль осмотически активного компонента (см. разд. 5). Несовместимость некоторых ингредиентов в режиме автоклавирования диктует необходимость приготовления среды в виде двух растворов, стерилизовать их по отдельности и объединять лишь перед употреблением, одновременно добавляя фосфат. Температура агара перед разливкой должна быть 50°C. Чтобы создать оптимальные условия для регенерации протопластов, свежезалитые чашки рекомендуется немного подсушить. Объяснить феномен более эффективной регенерации протопластов на подсушенных чашках еще предстоит, однако его реальность несомненна. Например, для *S. lividans* наилучшие результаты дает 5—10%-ная (по весу) усушка чашек. Этого можно достигнуть, либо оставив на определенное время свежезалитые чашки открытыми в ламинарном боксе, либо заливая чашки за 1—2 дня до использования (в зависимости от влажности атмосферного воздуха) и сохраняя их на лабораторном столе. В первом случае односторонний ток воздуха над чашками может вызвать неравномерное их подсыхание, что приведет к тому, что протопласты будут регенерировать на одной стороне чашки быстрее, чем на другой. Поэтому мы предпочитаем второй метод, однако он требует четкого планирования эксперимента. Оптимальная степень подсушивания чашек варьирует в зависимости от штамма.

4.6.1. Регенерация неохарактеризованных штаммов

Не исключено, что в случае неохарактеризованного штамма для достижения оптимального результата понадобится изменить состав регенерационного агара. Попробуйте выполнить следующие рекомендации в порядке их перечисления.

1. *Источник углерода.* Удостоверьтесь, что глюкоза — подходящий источник углерода для данного штамма.

2. *Содержание сахарозы.* R2 содержит 0,3 М сахарозу. Некоторые штаммы, например *S. rimosus*, лучше всего регенерируют на среде, содержащей 0,6 М сахарозу. Испробуйте интервал концентраций сахарозы от 0,2 до 0,8 М. Применение в качестве осмотически активного компонента других веществ, таких, как KCl, сорбитол и т. д., не дает положительного эффекта.

3. *Двухвалентные катионы.* R2 содержит 50 мМ Mg^{2+} и 20 мМ Ca^{2+} . Изменяя соотношение этих катионов в интервале 0—100 мМ, можно повысить эффективность трансформации некоторых штаммов.

4. *Содержание фосфата.* R2 содержит 0,005% KH_2PO_4 . Некоторые штаммы требуют более высокого уровня фосфата в среде

для оптимальной регенерации. Испробуйте различные концентрации вплоть до 0,025%.

5. *Пролин* в среде R2 присутствует. Для большинства штаммов он не является необходимым компонентом. В то же время другие аминокислоты, например аспарагин, могут повысить эффективность регенерации неохарактеризованного штамма или обеспечить его более активную споруляцию.

Время, которое требуется протопластам различных штаммов для полной регенерации, варьирует от трех дней до нескольких недель. Если данный штамм нуждается в длительной инкубации, следует загерметизировать чашки, обмотав их по окружности липкой лентой, чтобы избежать чрезмерного подсыхания агара.

Некоторые штаммы лучше регенерируют при температурах, несколько отличающихся от тех, которые считаются оптимальными для выращивания. Тем не менее начинать следует с температуры 30 °C.

4.7. Идентификация/селекция трансформантов

4.7.1. Плазмиды, экспрессирующие «летальный зигозис»

Идентификацию трансформантов в случае плазмид, не содержащих селективных маркеров (таких, например, как детерминанты лекарственной устойчивости), обычно осуществляют, используя феномен летального зигозиса (lethal zygozsis) [25]. На чашке, покрытой сплошным слоем регенерирующих протопластов, трансформанты выглядят как «оспины» (прозрачные зоны) на газоне нетрансформированных бактерий. Биологические основы этого явления, получившего название «летального зигозиса», неясны.

При большом разведении протопласты регенерируют как одиночные колонии. Когда начинается споруляция, с чашки делают реплику на газон клеток, не содержащих плазмиду. При подрачивании чашки-реплики трансформанты формируют на газоне «оспины».

4.7.2. Плазмиды, имеющие селективный маркер

Большинство разработанных в последнее время векторов для молекулярного клонирования в стрептомицетах имеет по крайней мере одну детерминанту лекарственной устойчивости, которая позволяет осуществлять селекцию трансформантов. Маркеры лекарственной устойчивости генетически доминантны. Чаще всего они кодируют ферменты, которые либо 1) модифицируют мишень данного лекарственного препарата, либо 2) химически

модифицируют молекулу самого лекарственного агента таким образом, что последний становится неэффективным. К первой группе можно отнести детерминанты устойчивости к тиострепτονу и эритромицину, обуславливающие специфическое метилирование хозяйских рибосом, которое блокирует присоединение к ним этих агентов. Представителями второй группы являются детерминанты устойчивости к виомицину и неомицину, кодирующие фосфотрансферазы, которые инактивируют эти вещества, делая их неспособными связываться с соответствующими мишенями.

После трансформации требуется определенное время для того, чтобы ферменты, ответственные за лекарственную устойчивость, накопились в клетке в достаточном количестве и обеспечили экспрессию соответствующего фенотипа. Следовательно, если трансформированные протопласты немедленно высеять на среду, содержащую антибиотик, они погибнут. Поэтому протопласты высевают на регенерационную среду без антибиотика, где в неселективных условиях регенерируют как трансформированные, так и нетрансформированные протопласты. Затем к регенерационной среде добавляют антибиотик: нетрансформированные протопласты погибают, а трансформанты выживают и развиваются в зрелые колонии. Антибиотик можно внести в мягкий регенерационный агар (0,6% R2) и залить таким агаром поверхность регенерационной чашки. Однако часто этот метод вызывает затруднения при отборе колоний, что делает практически невозможным приготовление реплик для повторного скрининга (колонии оказываются погруженными в агар). Альтернативным способом добавления антибиотика является следующий. Антибиотик растворяют в 1 мл 0,3 М сахарозы, выливают раствор на чашку и, держа ее наклонно, поворачивают до тех пор, пока раствор не смочит всю поверхность агара. Сахароза впитывается в агар за 1—2 сут последующей инкубации при 30 °C. Инкубатор должен быть установлен строго горизонтально, иначе раствор антибиотика стечет на край чашки, и тогда в этой зоне погибнут даже трансформанты; в то же время на остальной поверхности концентрация антибиотика будет столь низкой, что нетрансформированные протопласты будут продолжать расти.

Обычно для селекции трансформантов используют следующие концентрации антибиотиков (из расчета 1 мл раствора на чашку): тиострептон — 200 мкг/мл; эритромицин — 200 мкг/мл; неомицин — 10 мкг/мл; виомицин — 200 мкг/мл. Время внесения антибиотика нужно подбирать для каждого штамма индивидуально. Так, к протопластам *S. lividans* антибиотик добавляют через 18—24 ч после посева, тогда как протопласты *S. rimosus* требуют 24—28 ч роста в неселективных условиях. Для штаммов, протопласты которых полностью регенерируют за три не-

дели, оптимальной может быть 3—5-дневная инкубация на не-селективной среде перед добавлением антибиотика. Если внести антибиотик слишком рано, трансформированные протопласты погибнут, поскольку не успеют в полной мере экспрессировать устойчивый фенотип. Если же антибиотик добавить поздно, обрывки мицелия, которые случайно сохранились в суспензии протопластов (только очень хорошие препараты не содержат мицелия), успеют прорасти и подавить рост протопластов, поскольку последние растут гораздо медленнее.

Таким образом, существует довольно узкое «окно» для оптимального внесения антибиотика, и этот временной интервал надо определить эмпирически для каждого конкретного штамма. Очень приблизительно можно считать, что момент для добавления антибиотика настал, едва регенерирующие протопласты становятся видимыми на чашке — поверхность агара при этом как бы затуманивается.

5. Среда

Среды, упоминающиеся в методиках, описанных в данной главе, приведены ниже.

Раствор для обработки лизоцимом (на 500 мл):

50 г сахарозы
2,86 г TES (N-трис-(оксиметил) метил-2-аминоэтансульфо-
вая кислота)
0,217 г сульфата калия (2,5 мМ)
0,253 г хлорида магния (2,5 мМ, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$)
0,183 г хлорида кальция (2,5 мМ, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$)
1 мл раствора микроэлементов

рН раствора устанавливают 7,2, прежде чем довести водой его объем до окончательного. Разливают раствор по 100 мл во флаконы и автоклавируют при 121 °С в течение 15 мин. Перед использованием к каждой порции (100 мл) добавляют 0,5 мл 1%-ного раствора KH_2PO_4 .

Среда Р (на 1 литр):

5,73 г TES
103 г сахарозы
2,03 г $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
0,5 г K_2SO_4
3,68 г $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
2 мл раствора микроэлементов

Добавляя NaOH, доведите рН среды до 7,4. Автоклавируйте 15 мин при 121 °С. Непосредственно перед использованием внесите 1 мл 1% KH_2PO_4 /100 мл.

Агар R2

Состоит из двух компонентов, каждый из которых готовится отдельно.

R2/A (на 1 литр):

0,5 г K_2SO_4
20,2 г $MgCl_2 \cdot 6H_2O$
5,9 г $CaCl_2 \cdot 2H_2O$
20 г глюкозы
6 г пролина
0,2 г казиминокислот
4 мл раствора микроэлементов

Разлейте порциями по 100 или 200 мл; помните, что полная среда будет иметь вдвое больший объем. Добавьте агар из расчета 4,4 г на 100 мл раствора. Автоклавируйте 15 мин при 121 °С.

R2/B (на 1 литр):

11,5 г TES. Доведите рН до 7,4, добавляя NaOH
10 г дрожжевого экстракта
203 г сахарозы

Разлейте порциями по 100 или 200 мл. Автоклавируйте 15 мин при 121 °С. Перед заливкой чашек объедините R2/B и R2/A и добавьте по 1 мл 1%-ного раствора KH_2PO_4 на каждые 200 мл полной среды.

Раствор микроэлементов (на 1 л)

40 мг $ZnCl_2$
200 мг $FeCl_3 \cdot 6H_2O$
10 мг $CuCl_2 \cdot 2H_2O$
10 мг $MnCl_2 \cdot 4H_2O$
10 мг $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$
10 мг $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$

Среда для трансформации — «Т-смесь» (на 500 мл):

12,5 г сахарозы
7,35 г хлорида кальция ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$: 100 мМ)
0,218 г сульфата калия (2,5 мМ)
1 мл раствора микроэлементов

2,9 г малеиновой кислоты

Доведите рН до 8,0, добавляя 1М трисосновной и автоклавируйте при 121 °С 15 мин.

Streptomyces — YEME (на 1 л):

3 г дрожжевого экстракта
5 г пептона
3 г экстракта солода

10 г глюкозы
340 г сахарозы
1,15 г $MgCl_2 \cdot 7H_2O$
Автоклавировать 15 мин при 121 °С.

Streptomyces — TSB (на 1 л)

30 г TSB (Sigma)
Автоклавировать 15 мин при 121 °С.

Литература

1. Bibb M. J., Schottel J. L., Cohen S. N. *Nature*, **284**, 526 (1980).
2. Hopwood D. A., Chater K. F., Dowding J. E., Vivian A. *Bacteriol. Rev.*, **37**, 371 (1973).
3. Hopwood D. A., Wright H. M. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 3575 (1983).
4. Berdy J. *Process Biochem.*, **23**, 1980.
5. Fietelson J. S., Hopwood D. A. *Mol. Gen. Genet.*, **190**, 394 (1983).
6. Gil J. A., Hopwood D. A. *Gene*, **25**, 119 (1983).
7. Malpartida F., Hopwood D. A. *Nature*, **309**, 462 (1984).
8. Bibb M. J., Ward J. M., Kieser T., Cohen S. N., Hopwood D. A. *Mol. Gen. Genet.*, **184**, 223 (1981).
9. Delic V., Hopwood D. A., Friend E. J. *Mutat. Res.*, **9**, 167 (1970).
10. Hunter I. S., Friend E. J. *Biochem. Soc. Trans.*, **12**, 643 (1984).
11. Williams S. T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E. M. H., Sneath P. H. A., Sachin M. J. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 1743 (1983).
12. Kieser T., Hopwood D. A., Wright H. M., Thompson C. J. *Mol. Gen. Genet.*, **185**, 223 (1982).
13. Katz E., Thompson C. J., Hopwood D. A. *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 2703 (1983).
14. Richardson M. A., Mabe J. A., Beerman N. E., Nakatsukusa W. M., Fayerman J. T. *Gene*, **20**, 451 (1982).
15. Manis J. J., Highlander S. K. *Gene*, **18**, 13 (1982).
16. Thompson C. J., Ward J. M., Hopwood D. A. *Nature*, **286**, 525 (1980).
17. Bibb M. J., Ward J. M., Kieser T., Cohen S. N., Hopwood D. A. *Mol. Gen. Genet.*, **184**, 230 (1981).
18. Thompson C. J., Kieser T., Ward J. M., Hopwood D. A. *Gene*, **20**, 51 (1982).
19. Schrempf H., Hopwood D. A., Goebel W. J. *Bacteriol.*, **146**, 360 (1975).
20. Lydiate D. Ph. D. Thesis, University of East Anglia, Norwich, UK, 1984.
21. Harris J. E., Chater K. F., Bruton C. J., Piret J. M. *Gene*, **22**, 167 (1983).
22. Chater K. F., Bruton C. J., Springer W., Suarez J. E. *Gene*, **15**, 249 (1981).
23. Chater K. F., Bruton C. J. *Gene* (1984), in press.
24. Bibb M. J., Freeman R. F., Hopwood D. A. *Mol. Gen. Genet.*, **154**, 155 (1977).
25. Chater K. F., Hopwood D. A., Kieser T., Thompson C. J. In: *Gene Cloning in Organisms Other than E. coli*, Hofschneider P. H. and Goebel W. (ed.), Springer Verlag, Berlin, 1982.
26. Ogawa H., Imai S., Satoh A., Kojima M. J. *Antibiot.*, **36**, 184 (1983).
27. Rodicio M. R., Cater K. F. *J. Bacteriol.*, **151**, 1078 (1982).
28. Makins J. F., Holt G. *Nature*, **293**, 671 (1982).
29. Kieser T. *Plasmid* (1984), in press.

КЛОНИРОВАНИЕ В ДРОЖЖАХ

Родни Ротстейн

1. Введение

Данная глава адресована тем исследователям — а их число постоянно растет, — которые в качестве экспериментальной системы избрали дрожжи. Мы не планировали написать исчерпывающе полный обзор методов молекулярного клонирования в дрожжах — нашей целью было представить читателю лишь основные теоретические разработки и технические приемы, которые могут оказаться полезными при использовании дрожжей в генно-инженерных экспериментах. Все описанные методики применялись в работе с *Saccharomyces cerevisiae*. Многие экспериментальные процедуры были также успешно опробованы на дрожжах, не принадлежащих к роду *Saccharomyces*, и на некоторых нитчатых грибах. Первый раздел коротко касается методов идентификации клонированных векторов, трансформационным системам и общим методам отбора клонов. Заключительный раздел описывает технику манипулирования с клонированной ДНК дрожжей, включая методы направленной интеграции плазмид, «спасения аллеля», «нарушения гена» и повторных генных замещений.

2. Идентификация клонированных генов дрожжей

Для идентификации клонированных дрожжевых генов применяют различные методы. Первыми генами, выделенными из дрожжей, были гены структурных РНК — сначала рибосомной РНК [1], а затем тРНК [2]. Для идентификации индуцибельных генов на дрожжах апробировали метод дифференциальной гибридизации [3]. Позднее гены стали идентифицировать по способности комплементировать соответствующие генетические дефекты в *E. coli* [4, 5]. Применение охарактеризованных генов стимулировало разработку методов трансформации дрожжей [6, 7]. Введение этих методов в широкую исследовательскую практику позволило клонировать в дрожжах большое количество генов, используя феномен генетической комплементации; основной полученных генных банков служат векторы для молекулярного клонирования, описанные в разделе 3.1. Ниже мы коснемся некоторых методов идентификации клонированных генов дрожжей.

2.1. Клонирование генов структурных РНК и мРНК

Одним из наиболее простых и вместе с тем самым прямым методическим подходом к клонированию генов является использование в качестве зонда очищенной РНК. В случае структурных РНК, таких, как рРНК, тРНК и яРНК, получить высококачественный зонд относительно нетрудно. Эту РНК радиоактивно метят (либо ^{32}P с помощью полинуклеотидкиназы, либо ^{125}I — химическими методами) и затем используют для скрининга плазмидной или фаговой библиотеки [8]. Такой подход можно применить и в том случае, когда в качестве меченой пробы (зонда) выступает мРНК.

Отдельные популяции молекул мРНК, а также некоторые индивидуальные классы информационных транскриптов удается получать в чистом виде, используя различные методы обогащения, например фракционирование полисом.

2.2. Клонирование с использованием дифференциальной гибридизации

Скрининг клонов путем дифференциальной гибридизации впервые был осуществлен на дрожжевом банке при отборе генов, индуцируемых галактозой [3]. Геномную библиотеку дрожжей в λ -векторе высевали на чашки при плотности 500 бляшек на чашку. Через 24 ч с каждой чашки были сделаны двойные реплики на нитроцеллюлозные фильтры, которые затем гибридизовали с радиоактивно мечеными РНК- или кДНК-зондами, выделенными из клеток, находившихся в двух различных контрольных состояниях. Так, галактозные гены были отобраны на основании позитивного сигнала, полученного лишь в одной из параллелей, а именно при гибридизации с РНК-зондом, выделенным из клеток, индуцированных галактозой.

2.3. Клонирование с использованием методов гибридизационной селекции и скрининга антителами

Гены, белковые продукты которых уже охарактеризованы, можно идентифицировать с помощью метода гибридизационной селекции [9]. Метод основан на специфическом удалении из препарата тотальной мРНК тех информационных транскриптов, которые кодируют белковый продукт данного гена за счет гибридизационного связывания их с клонированной ДНК.

Сначала конструируют библиотеку клонов кДНК, полученной на основе суммарной мРНК (прежде чем приступить к клонированию, целесообразно обогатить препарат суммарной мРНК интересующими транскриптами). Затем выделяют ДНК инди-

видуальных клонов и гибридизуют с тотальной клеточной мРНК. После гибридизации несвязавшуюся мРНК транслируют *in vitro* и продукты трансляции анализируют на присутствие интересующего белка. Клон, ДНК которого при гибридизации с суммарной мРНК делает ее неспособной направлять синтез ожидаемого белкового продукта, и есть искомым клон. Альтернативный вариант эксперимента предполагает транслирование *in vitro* связавшейся РНК и соответствующий анализ полученных продуктов [14].

Ген, белковый продукт которого получен в очищенном виде, можно обнаружить и выделить с помощью антител к этому продукту. Антитела можно использовать и для детектирования перекрестно реагирующего материала (ПРМ), экспрессирующегося в гетерологичной системе, например *E. coli*. Так, ген гексокиназы был выделен из банка клонов дрожжевой ДНК путем фиксации тотального белка каждой бактериальной колонии на пластиковой подложке и последующего скрининга на ПРМ методом радиоиммунного анализа с использованием антител к гексокиназе [10]. Позитивный сигнал указывал на присутствие в ДНК соответствующего клона искомого фрагмента, который обеспечивает синтез данного белка в клетках *E. coli*. Не так давно был разработан новый фаговый вектор $\lambda\text{gt}11$, который специально предназначен для конструирования экспрессируемых библиотек, скринируемых антителами. В этом векторе был клонирован ряд генов дрожжей, включая гены нескольких субъединиц РНК-полимеразы [12] и ДНК-топоизомеразы [13]. Полное описание этой системы молекулярного клонирования можно найти в гл. 2 первого тома данной книги.

2.4. Клонирование с использованием перекрестной гибридизации

Эволюционно консервативные гены других видов можно использовать в качестве тест-проб для поиска гомологичных генов в геномных банках дрожжей. Этим методом были идентифицированы гены гистонов [54], гены некоторых гликолитических ферментов [15], а также протоонкогены [16]. Техника подобного эксперимента несложна. Сначала приготавливают геномный блот и тестируют его в условиях различной жесткости на наличие перекрестной гомологии. Подобранные на этой стадии условия гибридизации используют затем при скрининге фаговой или плазмидной библиотеки. Получение позитивного сигнала предполагает дальнейшее уточнение природы клонированного гена с помощью анализа первичной структуры ДНК, а также решение вопроса о том, является ли данный ген функционально активным в геноме дрожжей.

2.5. Клонирование с использованием комплементации в *E. coli*

Фрагменты ДНК дрожжей, кодирующие ферменты некоторых биосинтетических процессов, впервые были выделены с использованием феномена комплементации ауксотрофных мутаций *E. coli*. Так, например, штамм *E. coli*, имеющий аллель *leuB*, ревертирующий к дикому типу с низкой частотой (эта мутация затрагивает один из генов биосинтеза лейцина), трансформировали дрожжевой ДНК, введенной в соответствующий бактериальный вектор [4]. Трансформантов выращивали на селективной среде, содержащей антибиотик, устойчивость к которому обеспечивал соответствующий ген вектора, и затем скринировали полученный банк, используя в качестве критерия способность клонов расти на среде без добавления лейцина. Было отобрано несколько клонов, содержащих общую последовательность ДНК дрожжей. Клонированная последовательность комплементировала мутацию *E. coli* благодаря тому, что включала соответствующий дрожжевой ген биосинтетического пути лейцина *LEU2*. Это было подтверждено результатами дальнейшего анализа клонированного гена [6, 17], в частности генетического картирования и определения первичной структуры ДНК [18]. Подобным же образом благодаря комплементации соответствующих мутаций *E. coli* были выделены и некоторые другие дрожжевые гены, в том числе *HIS3* [5], *URA3* [19] и *TRP1* [20]. Эти гены нашли в дальнейшем широкое применение при конструировании векторов для молекулярного клонирования в дрожжах.

При конструировании векторов, содержащих эти гены, удобно использовать бактериальные штаммы, которые несут мутации, комплементируемые данными генетическими маркерами. Идентификация правильной конструкции в этом случае легко осуществляется по результатам простого комплементационного теста. Некоторые распространенные бактериальные штаммы, используемые в подобных тестах, приведены в табл. 1.

2.6. Клонирование с использованием комплементации в дрожжах

Клонирование генов с использованием феномена комплементации мутаций у дрожжей предполагает наличие геномной библиотеки дрожжей дикого типа в векторе, способном с высокой эффективностью трансформировать дрожжевые клетки. О конструировании дрожжевых векторов и их использовании будет подробно рассказано в разд. 3.1. Здесь мы лишь перечислим общие требования, предъявляемые к векторам для молекуляр-

Таблица 1. Распространенные бактериальные и дрожжевые штаммы, используемые в молекулярном клонировании

	Штамм	Генотип	Ссылка
А. Бактерии	C600	K12 <i>leuB6 thi-1 thr-1 lacY1 ton A21 supE44</i>	[4, 21]
	hisB463	K12 <i>hisB463 hsdR⁺ hsdM⁺</i>	[5]
	trpC9830	K12 <i>W3110 trpC117</i>	[22, 23]
	DB6656	K12 <i>pyrF::Mu trp_{am}lacZ_{am} hsdR⁻ hsdM⁺</i>	[19]
	BA1	K12 <i>leuB6 trpC1117 hisB463 Tn10::near hisB thr thi thyA str^r hsdR⁻ hsdM⁻</i>	Э. Мюррей (личное сообщение)
Б. Дрожжи	LL20	MAT α <i>leu2-3,112 his3-11,15</i>	[24]
	YNN281	MAT α <i>his-3Δ trp1-Δ ura3-52 ade2-101 lys2-801</i>	Р. Дэвис (личное сообщение)
	SR25-1A	Mata <i>his4-912 ura3-52</i>	Ш. Рёдер (личное сообщение)
	W301-18A	Mata <i>ade2-1 trp1-1 leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 can-100</i>	[25]

ного клонирования в дрожжах. Они должны содержать соответствующие генетические маркеры для селекции трансформантов и дрожжевую область начала репликации для обеспечения высокоэффективной трансформации, а также бактериальные генетические маркеры и область начала репликации для селекции и размножения в *E. coli*. Вводя в вектор случайные фрагменты дрожжевой ДНК, получают библиотеку клонов. Отбор рекомбинантов по комплементации осуществляется двумя способами. Один из них предполагает прямую селекцию по интересующему маркеру сразу после трансформации. Другой предусматривает первоначальную селекцию библиотеки по комплементации дрожжевого маркера, присутствующего во всех плазмидах, а затем — скрининг (или селекцию) трансформантов на комплементацию интересующего гена. Первая схема оправдана только в том случае, если интересующий ген характеризуется очень низкой частотой реверсий (менее чем 10^{-8}). Если частота реверсий выше, на чашках появится достаточно большое количество ревертантов, которые могут ввести в заблуждение при отборе клонов. Согласно второй схеме, сначала проводится селекция клонов с использованием генетического маркера, присутствующего в векторе и обладающего низкой частотой реверсий; это позволяет контролировать стадию трансформации. Затем трансформанты скринируют (или проводят их селекцию) на комплементацию интересующего гена. При использовании маркеров ауксотрофности селекция трансформантов осуществ-

вляется просто — путем приготовления реплик на соответствующей среде. Если фенотипическое выражение интересующего гена отлично от простой ауксотрофии, комплементационные тесты соответствующим образом видоизменяются. Например, ген радиационной чувствительности можно выявить, тестируя трансформанты на устойчивость к радиации [26]. В зависимости от типа библиотеки для обнаружения комплементирующего фрагмента необходимо провести скрининг от 1000 до 20 000 клонов.

Клонирование дрожжевых генов с использованием комплементации в целом оказалось довольно удачным методическим приемом. Однако известны два примера, когда определенные фрагменты дрожжевой ДНК не удалось обнаружить в библиотеках, полученных на основе плазмидных векторов и размноженных в *E. coli*. Так, Кэрл Ньюлон с соавторами в процессе «прогулки» по хромосоме III не смогла найти клон, который перекрывался бы с двумя уже охарактеризованными фрагментами (личное сообщение). Тогда она попыталась клонировать этот промежуточный фрагмент, используя метод заполнения бреши (gap repair): прилежащие последовательности должны были обеспечить гомологичное спаривание (см. разд. 4.2). Оказалось, что содержащие интересующий фрагмент бактериальные субклоны довольно плохо растут; это навело на мысль, что изначальная неудача с его клонированием в *E. coli* объясняется «недопредставленностью» этого фрагмента в первичной библиотеке. Гейбер и Финк столкнулись с трудностями при попытке выделить дрожжевой ген *holl* из плазмидной библиотеки (личное сообщение). Им пришлось сконструировать дрожжевую библиотеку *in vitro* и выделять нужный клон после прямой трансформации ею соответствующим образом маркированного штамма дрожжей. Анализ субклонов показал, что последовательность, прилежащая к гену *holl*, сильно замедляет рост содержащих ее бактериальных колоний.

Чтобы удостовериться в том, что функция комплементации задана плазмидой, надо показать, что в клетках, спонтанно утративших плазмиду, наблюдается одновременная утрата интересующего фенотипа и селективного маркера, общего для всех трансформантов. Спонтанную утерю плазмиды можно обнаружить, высев 500—10 000 колоний (приблизительно по 500 колоний на чашку) и сделав реплики на среду, первоначально использовавшуюся для селекции трансформантов. Отсутствие плазмиды выражается в неспособности расти на селективной среде. Утратившие плазмиду клоны затем тестируют на комплементацию интересующего гена. Число колоний, которое необходимо проанализировать, чтобы найти клон, утративший плазмиду, зависит от стабильности плазмиды. Некоторые плазмиды, содержащие центромерные области, настолько стабильны,

что частота их спонтанной утраты не превышает 10^{-3} на одно поколение.

В заключение отметим, что выделить из клонотеки комплементирующий фрагмент — еще не значит получить клон, содержащий интересующий ген. Известно несколько примеров, когда комплементирующие фрагменты не соответствовали искомому гену [27]. Методы, позволяющие устанавливать соответствие между клонированными последовательностями ДНК и интересующими генами, обсуждаются в разд. 4.3.

3. Векторы для молекулярного клонирования в дрожжах и методы трансформации

Создание векторов для молекулярного клонирования в дрожжах и разработка соответствующих методик трансформации осуществлялись практически одновременно. В первых успешных экспериментах по трансформации дрожжей были использованы дрожжевые гены, клонированные с использованием комплементации в *E. coli* [4, 6]. Затем стали использовать фрагменты эндогенных плазмид (2 мкм-кольцевых плазмид или 2 мкм-кольца), что позволило существенно повысить эффективность трансформации [7]. Были также обнаружены хромосомные последовательности, сообщающие вектору высокую трансформирующую способность [20]. Ниже мы приводим описание некоторых векторов и рекомендации по их использованию, а также методики трансформации дрожжей, поддержания и выращивания культур и селекции трансформантов. В табл. 1 включены некоторые наиболее широко используемые в трансформационных экспериментах штаммы дрожжей.

3.1. Векторы

Трансформация *Saccharomyces cerevisiae* предполагает два возможных пути развития событий — это интеграция и автономная репликация. Какой из этих путей реализуется, зависит от типа вектора и от того, в какой форме — интактной или линейизованной — вводится ДНК (см. разд. 4.1). У дрожжей интеграция плазмид осуществляется путем гомологичной рекомбинации. Плазмидные последовательности могут взаимодействовать с гомологичными участками на хромосоме двояким образом. Одна из возможностей — интеграция плазмиды в геном по участкам взаимной гомологии [6, 24]; другая — замещение участка хромосомной последовательности на плазмидную без интеграции вектора [6, 24]. Как то, так и другое событие наблюдается достаточно редко (приблизительно 1—10 трансформантов/мкг ДНК/ 10^7 клеток) при использовании кольцевых молекул, которые не способны к автономной репликации.

Высокой эффективности трансформации (10^3 — 10^4 трансформантов/мкг ДНК/ 10^7 клеток) можно добиться, если ввести в состав вектора определенные участки хромосом или 2мкм-колец [7, 20]. Эти последовательности позволяют вектору автономно реплицироваться и сообщают ему высокую трансформирующую способность. Подобные участки имеют обозначение *ars* (autonomously replicating segment) [20]. Плазмиды, содержащие *ars*-последовательности хромосомного происхождения, обычно нестабильны. Так, при культивировании дрожжей в неселективных условиях на протяжении 10 генераций плазида сохраняется менее чем в 5% клеток. В то же время плазмиды, содержащие соответствующие участки 2мкм-колец, более стабильны: от 60 до 95% клеток после десяти генераций сохраняют плазмиду при культивировании в неселективных условиях [28]. В обоих случаях плазмиды представлены в клетках относительно большим числом копий (от 20 до 50 на клетку). Для плазмидных векторов, сконструированных на базе 2мкм-колец, минимальное количество 2мкм-ДНК, необходимое для обеспечения стабильности, включает область *ger3* и обращенный повтор размером 599 п. н. Все остальные функции, кодируемые 2мкм-ДНК, могут обеспечиваться по *транс*-схеме другими эндогенными 2мкм-плазмидами [29].

Для повышения стабильности плазмидных векторов в них вводят добавочные последовательности. Например, при введении в состав плазмид, содержащих хромосомные *ars*-участки, центромерных последовательностей стабильность конструкций возрастает настолько, что через 10 генераций около 90% клеток сохраняют плазмиду [30]. Центромерные последовательности выступают также в роли модулятора количества копий плазмиды, сводя его к одной копии на клетку. Объединение в одной конструкции центромерных последовательностей и фрагментов 2мкм-плазмид обуславливает значительно более низкую стабильность, чем та, которая свойственна плазмидам, содержащим хромосомные *ars*-последовательности и участки центромер [28].

Недавно были сконструированы линейные плазмиды: теломерные зоны хромосом ресничных инфузорий или дрожжей ввели в состав плазмиды, чтобы получить автономно реплицирующуюся линейную молекулу [31]. Линейные плазмиды менее стабильны, чем кольцевые несущие центромерные последовательности: в 10-м поколении приблизительно 40% клеток содержит по 20—40 копий. Линейные молекулы можно дополнительно стабилизировать, если ввести в их состав дрожжевые центромерные последовательности и тем самым увеличить общий размер плазмиды [32]. Получившаяся в результате молекула по сути является минихромосомой, которая присутствует в клетке в единственном числе. Эта конструкция — наиболее стабильная из всех известных на сегодняшний день плазмид,

полученных *in vitro*, но в то же время она на два порядка уступает по этому параметру природным хромосомам.

И наконец, разработаны векторы, позволяющие осуществлять экспрессию клонированных генов и секрецию их белковых продуктов в дрожжевых клетках. Некоторые из экспрессирующих векторов имеют в своем составе сильные конститутивные промоторы — такие, например, как промотор алкогольдегидрогеназы [33], тогда как в других используются регулируемые промоторы таких генов, как ген UDP-галактоза-4-эпимеразы [29] или кислой фосфатазы [34]. При создании экспрессирующих векторных систем, обеспечивающих секрецию белковых продуктов, был использован участок гена, кодирующий сигнальный пептид полового феромона дрожжей — α -фактора [35].

В табл. 2 приведены примеры различных типов векторов, описанных выше. Для некоторых из них приведены ссылки на литературный источник, а также описаны свойства и потенциальные возможности.

3.2. Методы трансформации дрожжей

Первые два метода трансформации, разработанные для дрожжей, предусматривали удаление клеточной стенки с помощью β -глюканазы, обработку сферопластов ионами Ca^{2+} , внесение в суспензию сферопластов ДНК и наконец обработку полиэтиленгликолем (PEG 4000) [6, 7]. Затем трансформированные клетки промывали и погружали в осмотически стабилизированный регенерационный агар. На этих первоначальных разработках основывается методика, представленная в табл. 3. Эффективность трансформации сферопластов при использовании ДНК автономно реплицирующихся плазмид варьировала от 10^2 до 10^5 трансформантов/мкг/ 10^7 клеток в зависимости от штамма. Существенным моментом в этой процедуре является осторожное обращение со сферопластами, начиная с самых первых этапов их приготовления; клетки нельзя встряхивать на вибромиксере.

Недавно описана процедура трансформации, которая не требует удаления клеточной стенки и регенерации сферопластов. Согласно этому методу (см. методику 4), intactные клетки обрабатывают солями лития, смешивают с ДНК и затем добавляют PEG 4000 [38]. Селекцию трансформантов можно проводить, прямо высевая клетки на соответствующую агаризованную среду. Основной недостаток этого метода заключается в том, что для многих штаммов число трансформантов, получаемых при использовании автономно реплицирующихся плазмид, оказывается в 10—100 раз ниже, чем при трансформации сферопластов. В то же время эффективность трансформации «литиевых» клеток линейными плазмидами весьма высока (см.

Таблица 2. Векторы для молекулярного клонирования в дрожжах

Тип вектора	Пример (ссылка)	Описание	Свойства
Интегрирующийся	Y1p5 [23]	Вектор на основе рBR322, содержит селективный маркер <i>ura3</i> ⁺	Эта плаزمида «неохотно» рекомбинирует с некоторыми хромосомными аллелями <i>ura3</i> (например, <i>ura3-52</i> или <i>ura3-50</i>), поэтому дрожжевые последовательности, клонированные в этом векторе, в основном рекомбинируют с гомологичными им участками хромосом
Автономный высококопийный — 2 мкм	YEp13 [36] pJDB219 [7]	Векторы на основе рBR322 и рMB9 соответственно; содержат селективный дрожжевой маркер <i>LEU2</i> ⁺ и участки автономной репликации 2-мкм колец	Эти векторы трансформируют дрожжевые клетки с высокой эффективностью и реплицируются автономно. Обычно их используют для создания библиотек генов, скринируемых по комплементации. Присутствие нативных 2-мкм плазмид в хозяйских клетках повышает стабильность этих векторов
Автономный высококопийный-хромосомный	YRp7 [23] YRp17 (эквивалент YRp7 с уникальным сайтом <i>EcoRI</i>)	Векторы на основе рBR322; содержат ген <i>TRP1</i> ⁺ и прилежащие хромосомные <i>ars</i> -последовательности	Эти векторы трансформируют дрожжевые клетки с высокой эффективностью и реплицируются автономно. Трансформанты относительно нестабильны: в неселективных условиях в 10-м поколении около 90% клеток утрачивает плазмиду. Обычно векторы присутствуют в клетке во многих копиях. YRp7 был использован для клонирования генов дрожжей с использованием комплементации.
Автономный высококопийный-теломерный	YLp1 [31, 32]	Линейная плазмид с теломерными участками из рДНК макро-нуклеуса тетрахи-мены; содержит дрожжевой селективный маркер <i>LEU2</i> ⁺ в составе рBR322	Высококопийный вектор с относительно низкой стабильностью: в неселективных условиях только 10% клеток в 10-м поколении сохраняет плазмиду. Используется для клонирования теломерных последовательностей дрожжей и конструирования мини-хромосом

Продолжение

Тип вектора	Пример (ссылка)	Описание	Свойства
Автономный низ-копийный-центромерный	YCp19 [37]	Кольцевая плазмид на основе рBR322; содержит два селективных маркера <i>TRP1</i> ⁺ и <i>URA3</i> ⁺ , а также хромосомный участок <i>ars</i> и центромерную зону хромосомы IV	Низкокопийный вектор; относительно стабилен в неселективных условиях: в 10-м поколении сохраняется у 90% клонов. Удобен для клонирования генов, присутствие которых в клетке более чем в одной копии может оказаться летальным
Автономный низ-копийный-мини-хромосомный	YLP21 [32]	Линейная плазмид на основе YLp1; содержит дополнительные последовательности фага λ и центромерную зону хромосомы III дрожжей	Низкокопийный вектор; относительно стабилен. Удобен для изучения последовательностей существенных для реализации хромосомных функций
Экспрессирующий нерегулируемый	pAAN5 [33]	Кольцевая плазмид; содержит промотор алкоголь-дегидрогеназы с удобными сайтами для клонирования	Удобен для осуществления гиперэкспрессии генных продуктов в дрожжевых клетках
Экспрессирующий регулируемый	YEp51 [29] pYE4 [34]	Кольцевая плазмид; содержит регулируемые промоторы (галактозо- и фосфат-зависимые), экспрессию которых можно контролировать путем изменения концентрации экзогенного субстрата или используя генетические локусы, существенные для экспрессии	Удобен для осуществления регулируемой экспрессии генного продукта, гиперэкспрессия которого может оказаться вредной для клетки, а также для временного контроля экспрессии интересующего продукта
Экспрессирующий-секретирующий	pAB112 [35]	Кольцевая плазмид; содержит сигнальную последовательность про-цессинга гена α -фактора (MF α 1)	Последовательностью α -фактора обеспечивает секрецию малых белков в виде составных продуктов, одной из частей которых является сигнальный участок MF α 1

Таблица 3. Трансформация сферопластов

1. Нарастите культуру дрожжевых клеток до титра $1-3 \cdot 10^7$ /мл в 50 мл жидкой среды YPD¹⁾.
2. Промойте клетки дважды в 10 мл 1 М сорбитола (Aldrich) путем повторения цикла: осаждение в настольной центрифуге — ресуспендирование осадка.
3. Ресуспендируйте клетки в 5 мл 1 М сорбитола и добавьте 5 мкл β -меркаптоэтанола.
4. Приготовьте разведение суспензии 10^{-5} (в воде) и высейте 100 мкл на твердую среду YPD. Эта чашка будет служить контролем при подсчете доли погибших клеток в процессе приготовления сферопластов.
5. Добавьте 150 мкл глuzuлазы (Endo Laboratories Inc.) и инкубируйте при 30 °C при мягком покачивании в течение примерно 30 мин. Определите оптимальное время обработки глuzuлазой данного штамма путем изменения продолжительности инкубирования и подбора такого временного интервала, при котором 99% клеток превращаются в сферопласты и 10–20% их сохраняют способность к регенерации.
6. Приготовьте разведение 10^{-3} (в воде) и высейте 100 мкл на среду YPD, чтобы оценить долю выживших клеток.
7. Осадите сферопласты путем центрифугирования суспензии при 2500 об/мин²⁾ в течение 7 мин и мягко ресуспендируйте в 2 мл 1 М сорбитола. Доведите объем до 10 мл 1 М сорбитолом и снова осадите клетки центрифугированием. Повторите процедуру еще раз.
8. Еще раз ресуспендируйте сферопласты в 2 мл 1 М сорбитола. Доведите объем суспензии до 9 мл 1 М сорбитолом и добавьте 1 мл раствора: 0,1 М трис-HCl pH 7,4; 0,1 М CaCl₂. Осадите сферопласты и ресуспендируйте осадок в 1,6 мл 1 М сорбитола, содержащего 10 мМ CaCl₂.
9. Разделите клетки на порции по 0,2 мл. Для трансформации к каждой такой порции добавляйте ДНК (1–10 мкг) в объеме, не превышающем 20 мкл.
10. Инкубируйте клетки с ДНК при комнатной температуре в течение 10 мин. Тщательно суспендируйте клетки и добавьте 2 мл 50% (по весу) PEG 4000, смешанного с 0,2 мл раствора: 0,1 М трис-HCl pH 7,4; 0,1 М CaCl₂.
11. После 10 мин инкубации при комнатной температуре осадите сферопласты путем центрифугирования (см. стадию 7), затем ресуспендируйте клетки в 0,5 мл 1 М сорбитола, содержащего 10 мМ трис-HCl pH 7,4 и 10 мМ CaCl₂, высейте в 10 мл регенерационного агара³⁾ при температуре 45–50 °C на подходящую минус-среду.

¹⁾ Рецепт среды YPD приведена в табл. 5.

²⁾ Клетки или сферопласты осаждают, используя ротор 215 для клинической центрифуги IEC. Допустимы любые эквивалентные замены.

³⁾ Рецепт среды приведен в табл. 5.

разд. 4.1). Не менее важно и то, что в некоторых случаях гораздо удобнее собирать клетки с поверхности чашки, чем из толщи регенерационного агара.

Не так давно мы провели трансформацию клеток следующим образом: ресуспендировали свежую (двухдневную) колонию с YPD-чашки в 1,0 М LiCl, инкубировали клетки в течение 4–8 ч и затем обрабатывали их по методике, описанной в табл. 4, начиная с этапа 4. Эффективность трансформации для линейных молекул варьировала от 10 до 100 трансформантов/мкг/10⁷ клеток.

Таблица 4. Трансформация «литиевых» клеток

1. Нарастите культуру дрожжевых клеток в 100 мл среды YPD¹⁾ до $OP_{600}=0,4$ (примерно $1-2 \cdot 10^7$ клеток/мл).
2. Центрифугируйте клетки при 2500 об/мин в течение 7 мин в настольной центрифуге. Ресуспендируйте клетки в TE²⁾ и снова осадите центрифугированием.
3. Ресуспендируйте клетки в 1,5 мл 0,1 М LiCl (или 0,3 М LiOAc), приготовленного на буфере TE, и инкубируйте при 4 °C в течение 3–8 ч.
4. Отберите в пробирку с крышкой 200 мкл суспензии для трансформации и добавьте ДНК в количестве 1–10 мкг. Постарайтесь, чтобы объем добавляемой ДНК не превышал 1/10 объема реакционной смеси. Инкубируйте смесь при комнатной температуре в течение 30 мин, периодически мягко помешивая содержимое пробирки.
5. Тщательно ресуспендируйте клетки, добавьте 1,5 мл 40%-ного PEG 4000 и перемешайте, перевернув пробирку. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 1 ч.
6. Поместите клетки на 5 мин в баню с температурой 42 °C.
7. Центрифугируйте при 1500 об/мин в течение 7 мин. Промойте дважды осадок водой путем его повторного мягкого ресуспендирования и центрифугирования.
8. Ресуспендируйте клетки в 100 мкл воды и высейте на подходящий минус-агар¹⁾.

¹⁾ Рецепт среды приведен в табл. 5.

²⁾ TE: 10 мМ трис-HCl pH 7,4; 1 мМ ЭДТА.

В заключение упомянем еще одну процедуру трансформации, основанную исключительно на использовании полиэтиленгликоля (PEG 1000) [39]. Принципиальным моментом здесь является очистка PEG для удаления примесей, снижающих эффективность трансформации. Следует отметить, что эффективность трансформации как сферопластов, так и «литиевых» клеток зависит от партии PEG 4000 [40]. Мы пришли к выводу, что, подобрав хорошую партию PEG, можно значительно увеличить выход трансформантов.

3.3. Среда для культивирования дрожжей

Дрожжевые клетки растут на богатых средах. В качестве источника углерода чаще всего используют глюкозу, хотя здесь возможно большое разнообразие вариантов. В табл. 5 приведены некоторые наиболее употребимые среды для выращивания дрожжей. Продолжительность одной генерации для стандартного штамма составляет в среднем 60–90 мин (в жидкой среде YPD при 30 °C). Для получения ночной культуры клетки обычно вносят в среду в таком количестве, чтобы титр исходной культуры составлял $5 \cdot 10^4$ /мл.

Твердые среды готовят на основе жидких, добавляя агар до концентрации 2%. Синтетическая среда без добавочных питательных веществ (минимальная среда) может применяться

Таблица 5. Среды для культивирования дрожжей

Тип среды	Название	Состав
Богатая среда	YPD	1% Дрожжевой экстракт 2% Пептон 2% Декстроза
Богатая среда (не- сбраживаемый источ- ник углерода)	YPG	1% Дрожжевой экстракт 2% Пептон 3% Глицерин
Синтетическая среда	SD	0,17% Дрожжевые азотистые ос- нования без аминокислот и суль- фата аммония 0,50% Сульфат аммония 2% Декстроза
Полная синтетическая среда	COM	SD, содержащая по 20 мкг/мл аденинсульфата, L-аригинин-HCl L-гистидин-HCl, L-метионина, L-триптофана и урацила; по 30 мкг/мл L-изолейцина, L-лизин- HCl и L-тирозина; 50 мкг/мл L-фенилаланина; 60 мкг/мл L-лей- цина; 150 мкг/мл L-валина COM — минус один (или более) метаболит(ов)
Минус-среда	COM-метаболит. Обычно называ- ется просто «—» метаболит (напри- мер, COM — URA обозначают как —URA, что значит «минус—урацил»)	
Регенерационный агар	RA-метаболит	SD, содержащая 1 М сорбитол плюс 0,5% YPD; необходимые добавки в концентрациях, указан- ных для COM и 3% агар

Примечание: твердые среды готовят на основе жидких, добавляя агар до 2%.

для культивирования дрожжей дикого типа. Для культивирования ауксотрофных мутантов в синтетическую среду следует внести либо только те метаболиты, которые необходимы данному штамму, либо все двенадцать основных метаболитов (полная среда). Если в лаборатории постоянно работают с одним штаммом или с ограниченным их набором, удобнее использовать минимальную среду, дополненную метаболитами в соответствии с потребностями данного штамма. Если же в работе находится много штаммов, можно приготовить среду с «пропусками». «Пропуски» подразумевают отсутствие в среде одного из двенадцати основных метаболитов, вследствие чего такую среду называют также средой «минус метаболит» или минус-средой. Фенотип штамма можно определить путем переноса одной пробной колонии на различные минус-среды: ауксотрофность про-

явится в неспособности клеток расти на какой-нибудь одной из них.

Селекция по комплементации маркера ауксотрофности после трансформации осуществляется с помощью подходящей минус-среды. Метод трансформации сферопластов предусматривает регенерацию их в осмотически стабилизированной синтетической среде (табл. 5). В регенерационный агар вносят те же добавки, что и в селективную среду. Например, трансформантов с фенотипом LEU⁺ отбирают на среде без лейцина, помещая их в регенерационный агар, не содержащий этой аминокислоты. Если проводят трансформацию «литиевых» клеток, их высевают непосредственно на подходящую селективную синтетическую среду.

3.4. Гибридизация колоний

Проведя селекцию трансформантов, желательно удостовериться в том, что плазмидная ДНК действительно присутствует в дрожжевой клетке. Это особенно важно для некоторых процедур «спасения» аллеля, описанных в разд. 4.3. Обнаружение плазмидных (векторных) последовательностей значительно облегчается, если использовать метод гибридизации дрожжевых колоний [6], который основан на аналогичном методе, разработанном для бактериальных колоний [41]. Радиоактивный зонд приготавливают с использованием методов смещения одноцепочечных разрывов (ник-трансляция) или концевое мечения. Дрожжевые колонии выращивают в течение 24 ч на 85 мм фильтре, помещенном на чашку с YPD-агаром, затем этот фильтр обрабатывают по следующей схеме.

1. Нитроцеллюлозный фильтр кладут на лист бумаги Whatman 3MM, пропитанный раствором «зимолиазы 60 000» (2 мг/мл) или «зимолиазы 100Т» (1 мг/мл) в 1 М сорбитоле — 20 мМ ЭДТА pH 7,4, после чего помещают в герметичный сосуд (обычно это неглубокая стеклянная емкость — например, чашка Петри, — закрытая пластиковой пленкой) и инкубируют при 37 °C в течение 4 ч или ночи, чтобы удалить клеточную стенку.

2. Контролируют процесс формирования сферопластов: при помощи зубочистки отбирают две равные порции дрожжевой биомассы, одну из них помещают в каплю 1 М сорбитола, а другую — в каплю 10% SDS и наблюдают под микроскопом, образуются ли «тени» клеток. Можно обойтись и без проверки, приняв на веру, что после ночной обработки клеточные стенки достаточно деградированы для того, чтобы не препятствовать эффективному лизису клеток.

3. Нитроцеллюлозный фильтр осторожно снимают с бумаги, переносят на другой лист Whatman 3MM, пропитанный 0,1 М NaOH, и инкубируют при комнатной температуре в течение 7 мин.

4. Аккуратно переносят фильтр на следующую бумажную подложку, пропитанную 1 М трис-НСl pH 7,4, и инкубируют при комнатной температуре в течение 4 мин. Затем повторяют эту процедуру.

5. Выдерживают фильтр 2 мин на листе Whatman 3MM, пропитанном 2×SSC (1×SSC содержит 0,15 М NaCl и 0,015 М цитрата натрия).

6. Прогревают фильтр в вакуумной камере при 80°C в течение 2 ч.

Обработанный таким образом фильтр готов для гибридизации. Далее его кладут на поверхность воды, чтобы он намок (надо сказать, что нитроцеллюлозный фильтр не всегда намокает равномерно в тех местах, где находятся зафиксированные колонии), после чего запаивают в прочный полиэтиленовый пакет с 10 мл буфера (5×SSC, 1%-ный саркозил). В одном пакете можно гибридизовать не более двух фильтров (при условии, что они накладываются один на другой); при этом их следует класть так, чтобы колонии находились снаружи «сэндвича». Пока длится пре-гибридизация (ее продолжительность может составлять от 15 мин до 24 ч), подготавливают меченый зонд: около 500 000 имп/мин меченной ³²P нуклеиновой кислоты денатурируют кипячением в 2,5 мл воды (в расчете на 1 фильтр). Непосредственно перед гибридизацией к пробе, находящейся на кипящей водяной бане, добавляют равный объем 10×SSC и 2% саркозила; удаляют из пакета с фильтром пре-гибридизационный раствор и заливают туда радиоактивную пробу. Тщательно удаляют воздушные пузыри и запаивают пакет. Гибридизация длится 12—18 ч при 65°C. По истечении этого времени фильтр дважды промывают по 30 мин при 42°C, мягко покачивая его в растворе 2×SSC—0,5%-ный саркозил. Затем дважды промывают при 42°C в 2×SSC, высушивают на фильтровальной бумаге и экспонируют с ним рентгеновскую пленку. Если радиоактивный сигнал слаб, используют усиливающий экран [42]. Применяя описанную методику, можно обнаружить одиночную интегрированную копию плазмиды за 12—24 ч экспозиции, если, например, использовать в качестве меченого зонда никтранслированную ДНК pBR322 с удельной радиоактивностью около 10⁷ имп/мин/мкг [43].

3.5. Выделение дрожжевой ДНК и методы «спасения» плазмид

Выделение ДНК из дрожжей — обязательная процедура при конструировании библиотек клонов, а также при «спасении» или наработке плазмид — как интегрированных в геном, так и автономных. Очистка дрожжевой ДНК значительно упростилась со времени первых разработок Мармура и его коллег [44]. Относительно простой и быстрый метод получения дрожжевой

Таблица 6. Выделение дрожжевой ДНК

1. Нарастите 40 мл дрожжевой культуры в среде YPD до поздней логарифмической фазы (10⁸ клеток/мл).

2. Осадите клетки путем центрифугирования на центрифуге Sorvall RC5 в роторе SA600 или SS34 (или эквивалентном в другой центрифуге) при 5000 об/мин в течение 5 мин. Промойте клетки, ресуспендируя осадок в ТЕ, и снова осадите их центрифугированием.

3. Ресуспендируйте осадок в 3,2 мл 1 М сорбита 0,1 М ЭДТА; 14 мМ β-меркаптоэтанол; pH 7,4.

4. Чтобы удалить клеточную стенку, добавьте 0,1 мл раствора «зимолиазы 60 000» или «зимолиазы 100Т» (15 мг/мл) и инкубируйте при 37°C в течение 5 мин. Если используется более разбавленный раствор зимолиазы (например, 2 мг/мл), увеличьте продолжительность инкубации.

5. Проверьте эффективность обработки визуально, отобрав две аликвоты по 50 мкл в 200 мкл 1 М сорбита и в 200 мкл 10%-ного SDS. Переходите к следующим стадиям, если не менее 90% клеток превратилось в сферопласты.

6. Осадите сферопласты путем центрифугирования при 5000 об/мин в течение 5 мин, как описано в пункте 2.

7. Ресуспендируйте осадок в 3,2 мл ТЕ. Добавьте 0,3 мл 0,5 М ЭДТА и 0,3 мл 1 М трис-НСl pH 7,4 и тщательно перемешайте. Добавьте 0,16 мл 10%-ного SDS.

8. Перемешайте суспензию круговыми движениями и поместите на 30 мин на 65°C.

9. Добавьте 1 мл 4 М ацетата калия и инкубируйте во льду в течение 1 ч.

10. Центрифугируйте при 15 000 об/мин в течение 25 мин, как описано в пункте 2. Аккуратно перенесите надосадочную жидкость в чистую пробирку.

11. К надосадочной жидкости добавьте 12 мл 95%-ного этанола, перемешайте и центрифугируйте при 15 000 об/мин в течение 15 мин при комнатной температуре, как описано в пункте 2. Удалите надосадочную жидкость и осадок высушите на воздухе.

12. Ресуспендируйте осадок в 3 мл ТЕ. Если раствор содержит нерастворимые частицы (остатки клеток), удалите их центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 10 мин, как описано в пункте 2.

13. Перенесите раствор в 14 мл полипропиленовую пробирку, добавьте 150 мкл раствора панкреатической РНКазы (1 мг/мл) и инкубируйте при 37°C в течение 30 мин.

14. Экстрагируйте раствор смесью фенол, хлороформ, изоамиловый спирт (25:24:1).

15. Верхнюю фазу отберите, доведите концентрацию соли в ней до 0,3 М и добавьте 2 объема холодного 95%-ного этанола. Перемешайте и оставьте при -20°C на 2 ч или на более продолжительное время.

16. Осадите ДНК путем центрифугирования при 10 000 об/мин, 4°C в течение 30 мин (см. пункт 2).

17. Удалите надосадочную жидкость, осадок высушите на воздухе и растворите в 0,5 мл ТЕ.

ДНК недавно предложен в лаборатории Дэвиса [45]. Приведенная здесь методика (табл. 6) основывается на аналогичной процедуре и позволяет получить приблизительно 10—50 мкг ДНК из 40 мл культуры дрожжей. Количественные параметры всей схемы можно пропорционально уменьшить с таким расчетом, чтобы выделять ДНК из 5 мл культуры — полученной ДНК

будет достаточно для большинства процедур. Эти препараты ДНК можно использовать и при наработке плазмид.

Автономно реплицирующиеся плазмиды удобно нарабатывать путем непосредственной трансформации бактериальных клеток выделенной дрожжевой ДНК [8]. Обычно 100—300 нг суммарной дрожжевой ДНК в зависимости от компетентности бактериального штамма и копийности плазмиды позволяют получить от 100 до 300 трансформантов. Лучше всего трансформировать компетентные бактерии (200 мкл сконцентрированных в 20 раз клеток, полученных из культуры с $OP_{600} = 0,6$) не более чем 300 нг суммарной ДНК, поскольку количество трансформантов уменьшается в присутствии большого избытка ДНК. Интегрированные плазмиды нарабатывают следующим образом. Расщепляют суммарную дрожжевую ДНК (~300 нг) подходящей рестрицирующей эндонуклеазой (см. разд. 4.2). Реакционную смесь разбавляют до 1 мл и инкубируют с АТР и ДНК-лигазой Т4 в течение ночи при 15°C [8]. Затем этой ДНК трансформируют компетентные бактериальные клетки [8]; результат будет приблизительно таким же, как в случае автономных плазмид.

4. Манипулирование с клонированными ДНК

В некоторых случаях, после того как фрагмент ДНК идентифицирован, для изучения экспрессии гена возникает необходимость ввести его обратно в геном. Мы обсудим несколько способов введения фрагментов ДНК в специфические участки хромосом. Описанные методы можно использовать в целях пре-селекции участков интеграции для плазмид, содержащих множественные дрожжевые последовательности, для «спасения» аллеля, в процедурах «нарушения гена» и замещения гена. Все эти методы основываются на гомологичной рекомбинации между вводимой ДНК и дрожжевой хромосомой.

4.1. Направленная интеграция плазмид

Описан эффективный метод введения плазмид в геном дрожжей путем стимулирования гомологичной рекомбинации [24]. Этот метод использует способность дрожжей репарировать двухцепочечные разрывы в ДНК для инициации рекомбинационных процессов с участием геномной ДНК и вводимых линейных фрагментов. В том случае, когда плаزمида содержит две или большее число областей гомологии с геномной ДНК, в середину той зоны, которая гомологична интересующему геномному сайту, вносят двухцепочечный разрыв с помощью рестрицирующей эндонуклеазы. Линеаризованные таким образом молекулы вводят в дрожжевые клетки, трансформируя штаммы, несущие со-

ответствующие генетические маркеры. Трансформацию проводят либо со сферопластами, либо с «литиевыми» клетками [6, 7, 38]. Обычно 1—10 мкг ДНК хватает, чтобы получить от нескольких единиц до нескольких тысяч трансформантов в расчете на 10^7 клеток. Трансформантов, содержащих плазмидную ДНК, идентифицируют с помощью гибридизации колоний, после чего можно приступить к выделению ДНК из «положительной» колонии [6]. Затем проводят геномную блот-гибридизацию для уточнения сайта интеграции и выяснения, не имела ли место множественная тандемная интеграция плазмид в данный участок генома [24].

4.2. Методы «спасения» аллеля

Генетические исследования часто выдвигают задачу клонирования мутантных аллелей интересующего гена. Если уже клонирован фрагмент ДНК, содержащий ген дикого типа, относительно несложно получить клоны, несущие его мутантные аллели. Один из подходов основан на использовании гомологичной рекомбинации между геном дикого типа, находящимся в составе плазмиды, и мутантным геном на хромосоме для введения поблизости от интересующего аллеля векторной последовательности (рис. 1, А). Вследствие дупликации последовательности в месте интеграции мутантный аллель оказывается расположенным по одну сторону вектора, а аллель дикого типа — по другую. Поскольку точная топография рекомбинантной области неизвестна (она зависит от того, в каком месте относительно мутантной области произошел интегративный кроссинговер), «извлечение» интересующей мутантной последовательности требует независимого клонирования каждой из дуплицированных копий, фланкирующих вектор. В примере, представленном на рис. 1, А, следующим шагом будет выделение двух самостоятельных плазмид с помощью независимого расщепления геномной ДНК двумя рестриктазами, специфичными к участку *a* и к участку *d*. После рестриктазной обработки ДНК лигируют, трансформируют ею *E. coli* и затем выделяют обе плазмиды, как это описано в разд. 3.5.

Как мы уже говорили, в данном случае заранее неизвестно, какая из дуплицированных копий представляет мутантный аллель. Однако разработано несколько методов, позволяющих обойти это препятствие. Согласно одному из них [46], небольшой фрагмент ДНК, прилежащий к интересующему гену, клонируют в составе интегрирующего вектора, который несет селективный дрожжевой маркер (например, *Ura5*). Интеграция в гомологичную хромосомную область осуществляется за счет линеаризации плазмиды с разрывом внутри клонированной последовательности, как это описано в разд. 4.1. В результате

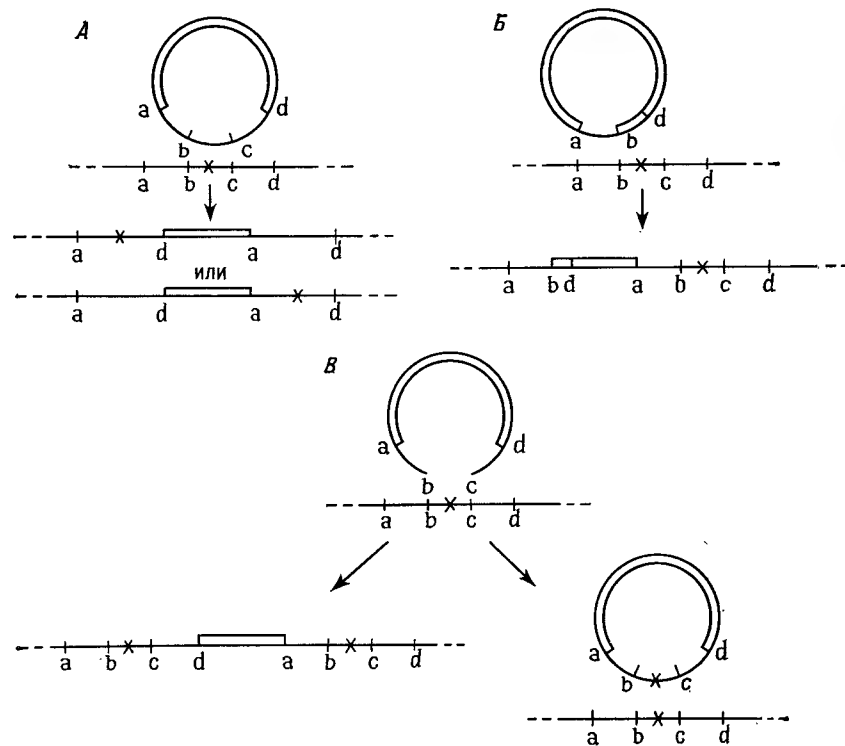


Рис. 1. Методы спасения аллеля. А. Плазмида, содержащая копию интересующего гена, интегрируется в геном. В результате интегративной рекомбинации с гомологичной мутантной хромосомной последовательностью происходит дупликация данного гена, причем одна из копий оказывается мутантной, а другая — дикого типа. Поскольку интересующий мутантный фрагмент может располагаться с равной вероятностью с одной или с другой стороны плазмидной последовательности, геномную ДНК расщепляют независимо рестриктазами, узнающими сайты *a* и *d*. Формирующиеся в результате последующего лигирования плазмиды нарабатывают и выделяют, как описано в тексте. Б. Плазмида, содержащая субклонированный фрагмент, соседствующий в геноме с интересующей мутантной областью, интегрируется в геном. При этом интегрированная плазмида всегда локализуется с одной и той же стороны мутантного участка. Расщепление геномной ДНК рестриктазой, узнающей сайт *d*, позволяет в дальнейшем наработать и выделить плазмиду, несущую желаемую мутантную область (см. текст). Для этого плазмида должна иметь бактериальную область начала репликации и селективный маркер. В. Плазмиду, содержащую *arg*-последовательность и копию интересующего гена дикого типа, линейризуют с помощью подходящих рестриктаз таким образом, чтобы удалить часть клонированной последовательности дикого типа (например, удаляют область между сайтами *b* и *c*). Такой линейризованной плазмидой трансформируют дрожжевые клетки, несущие мутацию в интересующем гене. Процесс репарации бреши в клонированной последовательности *in vivo* может привести: 1) к стабильной интеграции плазмиды в геном и к дупликации мутантного локуса (две мутантные копии гена разделены плазмидной последовательностью) и 2) к возникновению автономно реплицирующейся плазмиды, несущей мутантную копию гена. Эти плазмиды выделяют, как описано в тексте.

происшедшей гомологичной рекомбинации вектор встраивается рядом с интересующим нас аллелем (см. рис. 1, Б). Трансформантов, содержащих плазмиду, идентифицируют с помощью гибридизации колоний, затем выделяют из них хромосомную ДНК и определяют топографию рекомбинантной области с помощью геномной блот-гибридизации. Для извлечения плазмиды хромосомную ДНК расщепляют подходящей рестриктазой (в данном случае специфичной к участку *d*, см. рис. 1, Б). Такой фермент расщепляет вектор (недалеко от его края) «выше» интересующего гена, а прилежащую последовательность хромосомной ДНК — «ниже». Вырезание должно происходить таким образом, чтобы образовавшаяся в результате плазмида (нарабатываемая затем в *E. coli*) содержала селективный маркер (например, ген устойчивости к ампициллину) и плазмидную область начала репликации.

Другой метод, также обеспечивающий выделение мутантного аллеля, использует феномен репарации бреши (рис. 1, В, [40]). Конструируют плазмиду, несущую селективный маркер и интересующую генетическую область дикого типа (целиком). Эту конструкцию обрабатывают подходящей рестриктазой (или рестриктазами), чтобы удалить часть последовательности гена дикого типа (область *b*—*c*, см. рис. 1, В); в то же время по краям плазмиды сохраняются области гомологии с соответствующими хромосомными районами. Линейные молекулы вводят в мутантный штамм и идентифицируют трансформантов, экспрессирующих селективный маркер. В процессе рекомбинации происходит репарация бреши в плазмиде на матрице мутантной хромосомной последовательности. В результате в области интеграции мы обнаруживаем плазмидную последовательность, фланкированную двумя идентичными мутантными копиями хромосомного аллеля. Векторную последовательность обнаруживают с помощью гибридизации колоний, а топографию рекомбинантной области определяют с помощью геномной блот-гибридизации. Извлечение плазмиды, содержащей как одну, так и другую фланкирующую копию, дает в руки исследователя клонированный мутантный аллель интересующего гена.

Описанный выше метод с использованием репарации бреши можно модифицировать так, чтобы получить автономно реплицирующуюся плазмиду, которая содержала бы интересующий мутантный аллель (рис. 1, В, [40, 47]). Такую плазмиду можно прямо выделять из препаратов суммарной дрожжевой ДНК путем трансформации компетентных клеток *E. coli* — отпадает необходимость в рестриктазной обработке и последующем лигировании хромосомной дрожжевой ДНК. Этот метод предполагает наличие в плазмиде участков, ответственных за автономную репликацию. Согласно приведенной схеме из линейной молекулы, содержащей селективный дрожжевой маркер и *arg*-по-

следовательности, удаляют часть аллеля дикого типа, комплементирующую данную хромосомную мутацию. Отобранные трансформанты будут представлены двумя типами рекомбинантов, которые возникают с равной вероятностью после репарации бреши в зоне делеции. Один из них описан выше — это интегрированная плазмида, с двух сторон фланкированная копиями мутантного аллеля. Альтернативным вариантом будет автономно реплицирующаяся плазмида, содержащая мутантный аллель, который возник в результате репарации бреши на матрице хромосомного аллеля. Колонии, несущие автономно реплицирующиеся плазмиды, легко идентифицировать, если подрастить клетки в течение ночи на неселективной среде. В отличие от колоний, содержащих интегрированную плазмиду, эти клоны нестабильны в отношении селективного маркера. Далее из трансформантов выделяют суммарную дрожжевую ДНК, ею трансформируют клетки *E. coli* и извлекают плазмиду, несущую интересующий аллель.

4.3. Методический прием «нарушение гена»

Иногда возникает задача нарушить ген, скажем, для изучения нулевого фенотипа или для того, чтобы на генетическом уровне показать, что именно клонированный фрагмент определяет данный конкретный фенотип. В последнем случае недостаточно продемонстрировать тесную генетическую связь между геном и плазмидой, встроившейся путем гомологичной рекомбинации в соответствующий хромосомный локус: всегда остается формальная возможность того, что вы клонировали супрессорную мутацию. Следовательно, возникает необходимость прямо продемонстрировать, что клонированный фрагмент кодирует данный фенотип. Это достигается путем искусственного нарушения структуры гена в районе клонированного фрагмента: нарушенный аллель замещает интактный ген в соответствующем хромосомном локусе, что в идеале сопровождается утратой дикого фенотипа. С целью практического решения этой задачи был разработан ряд методических подходов, известных как «трансплантация гена», «нарушение гена» и «замещение гена». Суть их одинакова и сводится к введению нефункциональной копии интересующего гена в соответствующий нормальный хромосомный локус.

Первым шагом в стратегии замещения гена является локализация всех генетических значимых районов в клонированном фрагменте ДНК. Для этого строят транскрипционную карту или анализируют последовательность на предмет потенциально активных генов [8]. Эти области служат мишенями для различных манипуляций *in vitro* с клонированным фрагментом — в частности, для инсерционного или делеционного мутагенеза.

Затем, если фрагмент был идентифицирован по комплементации, мутировавший клон вводят в подходящее генетическое окружение и снова тестируют на комплементацию. Неспособность комплементировать указывает на то, что интересующий нас ген нарушен. Существом направленного мутагенеза могут быть простые делеции рестрикционных фрагментов, случайные инсерции линкеров [48] или рестрикционных фрагментов (последние могут иметь даже сравнимую с геном величину) [25]. Следующий шаг — введение носителя мутации в геном.

Если предположительно определена локализация гена, в распоряжении экспериментатора имеется несколько способов его «разорвать» или нарушить. Один из методов предполагает субклонирование внутренней зоны гена в составе интегрирующего вектора, несущего селективный маркер [49]. Гомологичная рекомбинация между этим клонированным участком и хромосомным локусом приведет к нарушению гена — его физическому «разрыву» и отделению интактного 5'-конца от интактного 3'-конца (рис. 2, А). Поскольку клонированный внутренний фрагмент не содержит интактных 5'- или 3'-концов, оба дублированных участка, фланкирующие плазмиду, не способны обеспечить реконструкцию интактного гена. Преимуществом этого подхода является единственная стадия интеграции, а также сцепления генетического маркера, а именно селективного плазмидного гена, с нарушенным фенотипом. Подобное генетическое сцепление оказывается весьма полезным при генетических исследованиях, позволяя следить за фенотипом как в отсутствие нарушения гена, так и при его наличии. Перечислим также ограничения метода.

1. Он дает возможность получить генетические дефекты только одного типа.

2. Многие гены не содержат таких рестрикционных фрагментов, наличие которых необходимо для проведения подобного эксперимента.

3. Размер «нарушаемого» гена ограничен, так как фрагменты, имеющие в длину менее 250 пар оснований, неэффективно рекомбинируют с геномом.

4. Нарушения гена нестабильны: благодаря генетической рекомбинации происходит разрушение дубликаций с частотой в некоторых случаях до 10^{-2} .

Другая процедура нарушения гена предполагает трансплантацию мутировавшей в составе плазмиды последовательности в геном, т. е. замещение ею нормальной хромосомной копии [50]. Схематически этот подход изображен на рис. 2, Б. Сначала вводится мутация в клонированный интересующий ген, который находится в составе плазмиды, несущей селективный маркер (обычно *URA3⁺*). Затем осуществляется гомологичная рекомбинация этой плазмиды с аллелем дикого типа в геноме.

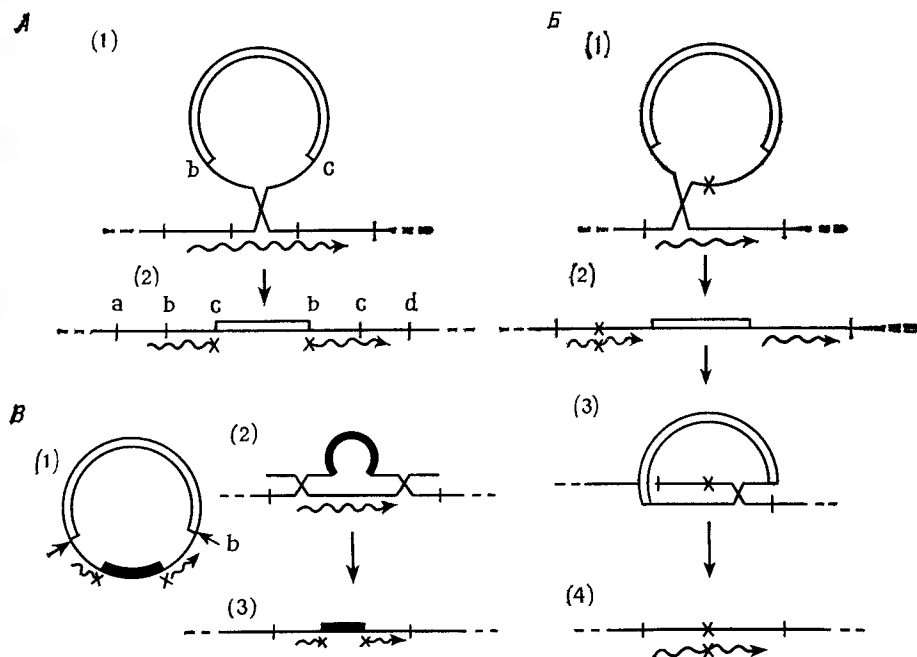


Рис. 2. Методы нарушения гена. А(1). Плазмида, содержащая внутренний фрагмент интересующего гена, интегрируется путем гомологичной рекомбинации в соответствующий локус хромосомы. А(2). В результате внедрения плазмиды последовательность гена оказывается разорванной. Б(1). Плазмида, содержащая желаемым образом измененный ген, интегрируется в гомологичную область хромосомы. Б(2). В результате интегративной рекомбинации происходит дупликация данного гена, причем одна из копий оказывается мутантной, а другая — дикого типа. Б(3). Проводят селекцию или скрининг на выщепление плазмиды. Б(4). В результате эксцизии у определенной части клеток в геноме остается мутантная копия гена. В(1). В последовательность интересующего гена, клонированного в плазмиде, внедрен селективный маркер (зачерненный участок). Плазмиду расщепляют рестриктазами (узнающими сайты а и б) для того, чтобы удалить векторную последовательность. В(2). Линейной ДНК трансформируют дрожжевые клетки и проводят селекцию на введенный маркер. В(3). В результате гомологичной рекомбинации происходит замещение хромосомного гена поврежденной копией.

Рекомбинационный кроссинговер может происходить с равной вероятностью по обе стороны от мутировавшего участка; в месте внедрения плазмиды возникает дупликация, причем одна из копий представляет мутантный ген, а другая — ген дикого типа. Следующий этап предполагает еще один акт рекомбинации, в результате которого плазмида выщепляется таким образом, что в геноме остается только мутантная копия гена. Успешное завершение этой процедуры требует, чтобы точка второго кроссинговера, который обеспечивает удаление вектора из ге-

нома, располагалась по другую сторону от мутантного участка относительно точки первого кроссинговера. В случае *URA3⁺*-содержащих плазмид выщепление вектора облегчается благодаря селекции на среде с 5-фтороротовой кислотой (см. разд. 4.4). Рекомбинантов скринируют на отсутствие векторной последовательности с помощью гибридизации колоний, а на присутствие мутантного фрагмента — либо по соответствующему фенотипу, либо с помощью блот-гибридизации хромосомной ДНК. Основное достоинство описанного метода заключается в том, что он позволяет вводить в клонированный генный фрагмент практически любые изменения, лишь бы его гомология с геном дикого типа оставалась достаточной для того, чтобы обеспечить рекомбинацию и кроссинговер. Ограничения же налагаются главным образом двухстадийным процессом получения желаемой мутации. Наиболее трудными оказываются повторные генные замещения в интересующей области генома, поскольку каждое отдельное нарушение гена требует выполнения всей вышеописанной двухэтапной процедуры.

Третий способ замещения гена основывается на способности свободных концов ДНК стимулировать генетическую рекомбинацию [25]. Сначала в середину клонированной копии интересующего гена вводят селективный генетический маркер (рис. 2, В1). Затем удаляют всю или большую часть плазмидной векторной последовательности, получая в результате линейную молекулу, свободные концы которой могут спариваться с хромосомой. Вследствие происходящей здесь гомологичной рекомбинации хромосомная копия гена замещается на нарушенную *in vitro* копию. Нарушения, которые вводятся в ген с помощью данного метода, сводятся в основном к простым инсерциям, являющимся результатом клонирования селективного маркера в единственный рестрикционный сайт. Возможны также делеции, если селективный маркер замещает удаляемый из плазмиды рестрикционный фрагмент. Метод имеет следующие достоинства.

1. Для того чтобы нарушить хромосомный ген, требуется только осуществить трансформацию.

2. Нарушенный участок сцеплен с генетическим маркером.

3. Нарушение гена необратимо.

Ограничение метода связано с тем, что не всегда можно найти рестрикционный сайт, подходящий для простой инсерции.

4.4. Методы замещения гена

Одно из преимуществ молекулярной генетики дрожжей заключается в том, что исследователь имеет возможность изменять ген *in vitro*, вводить его точно в надлежащее место в геноме и анализировать генетические последствия такого измене-

ния. Разработан ряд методических приемов, которые позволяют независимо вводить в соответствующий хромосомный локус различные мутантные копии данного гена. Один из таких технологических принципов мы рассмотрели в предыдущем разделе [50]. Недавно разработан еще один подход, который предусматривает использование рецессивного маркера лекарственной устойчивости и соответствующего гена дикого типа, экспрессирующего «чувствительный» фенотип [51]. Сначала нужный штамм делают устойчивым к циклогексимиду по локусу *cyh2* (ген, кодирующий рибосомный белок). Затем ген дикого типа, *CYH2*, обуславливающий чувствительность к циклогексимиду, вводят в интересующий нас ген, который клонирован в плазмиде, несущей селективный маркер. Используя технику «трансплантации гена», копию интересующего гена, нарушенную внедрением *CYH2*, вводят в «устойчивый» геном, замещая ею копию дикого типа (см. рис. 3, А). В результате получается штамм, который чувствителен к циклогексимиду благодаря экспрессии фрагмента *CYH2*. В этот штамм вводят мутантную копию интересующего гена, трансформируя его кольцевой плазмидой или линейным фрагментом. Выдерживают необходимое для экспрессии фенотипа время и проводят селекцию рекомбинантов на среде, содержащей циклогексимид. Замещение нарушенной внедрением хромосомной области *CYH2* его мутантной копией сопровождается утратой *CYH2*-ДНК, что запускает экспрессию рецессивного циклогексимидостойчивого фенотипа (гена *cyh2^r*). Аналогичная стратегия с использованием канаваниновой устойчивости и соответствующего гена дикого типа также оказалась успешной в плане осуществления повторных замещений. Недостаток метода заключается в том, что все штаммы, содержащие измененные гены, экспрессируют их на циклогексимидостойчивом генетическом фоне. Этот фон может оказаться неблагоприятным для изучения интересующего гена (особенно в плане трансляционных исследований).

Другой недавно предложенный метод для осуществления множественных генных замещений базируется на достижениях генетики супрессорных мутаций дрожжей (Ким Назмит, личное сообщение). Штаммы, имеющие мутацию *can1-100*, устойчивы по отношению к канаванину — аналогу аргинина, обладающему цитотоксическим действием. Штаммы, которые несут аллель *can1-100*, но обладают эффективной *ochre*-супрессией, чувствительны к канаванину, поскольку мутация *can1-100* супрессируется *ochre*-супрессорами.

Предложенный метод предполагает введение *ochre*-супрессора в интересующий ген с последующим замещением этим рекомбинантным фрагментом гена дикого типа; замещение производится на генетическом фоне *can1-100*, и в результате штамм становится чувствительным к канаванину (рис. 3, Б). Его транс-

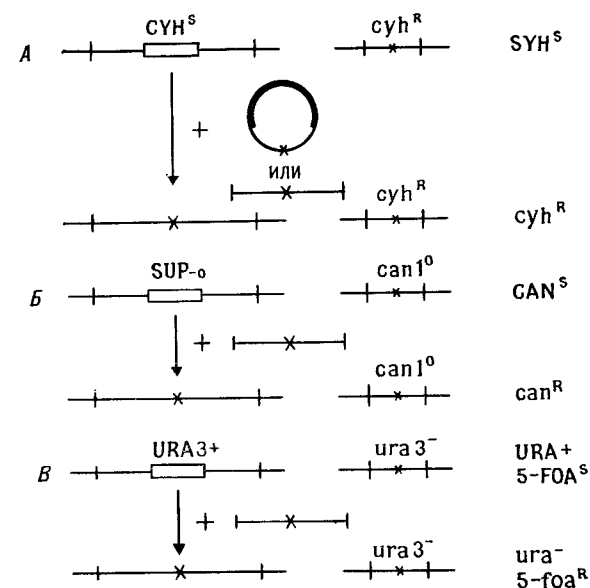


Рис. 3. Методы замещения гена. А. Сначала в устойчивом к циклогексимиду штамме (*cyh2^r*) в последовательность интересующего гена внедряют фрагмент ДНК, содержащий ген дикого типа *CYH2*. Штамм становится чувствительным к циклогексимиду. Затем этот штамм трансформируют либо кольцевыми плазмидами, либо линейными молекулами (без плазмидной последовательности), содержащими желаемым образом измененный ген. Замещение интересующего гена, содержащего последовательность *CYH2*, на мутантную копию обуславливает реверсию штамма к циклогексимидостойчивому фенотипу. Б. В штамме, содержащем супрессируемый *ochre*-супрессором аллель канаваниновой устойчивости (*can1^O*), в последовательность интересующего гена внедряют фрагмент ДНК, несущий *ochre*-супрессор (*SUP-o*). Этот штамм трансформируют линейными молекулами, содержащими желаемым образом измененный ген. Акт замещения можно обнаружить по восстановлению канаваниновой устойчивости. В. В *ura3⁻*-штамме, в последовательность интересующего гена внедряют фрагмент, содержащий *URA3⁺*. При этом штамм становится чувствительным к 5-фтороротовой кислоте. Его трансформируют линейными молекулами, содержащими желаемым образом измененный ген. В результате замещения утрачивается фрагмент, содержащий *URA3⁺*, и восстанавливается устойчивость клеток к 5-фтороротовой кислоте.

формируют линейными фрагментами ДНК, которые содержат различные измененные формы интересующего гена. Поскольку утрата супрессорной активности может объясняться разными причинами, проводят котрансформацию штамма наряду с линейными молекулами кольцевыми автономно реплицирующимися молекулами, чтобы обогатить популяцию канаванинустойчивых клеток трансформантами. Отобранные канаванинустойчивые колонии тестируют затем на замещенный ген с помощью геномной блот-гибридизации или идентифицируют по фенотипу.

Использование котрансформации оправдало себя и в тех случаях, когда не было возможности проводить селекцию генных замещений (Стратерн, Клар, личное сообщение; Руфолд и Хинен, личное сообщение). Линейные фрагменты, содержащие желаемым образом видоизмененный ген, вводили в клетки вместе с кольцевыми автономно реплицирующимися плазмидами, увеличивая тем самым количество трансформантов. Приблизительно 1% трансформантов содержал замещенный ген. Этот метод целесообразно применять тогда, когда замещение гена обуславливает появление характерного фенотипа. Для этого исходный штамм должен нести генетически маркированное нарушение интересующего гена (например, инсерцию *HIS3* в данный ген). Трансформантов в данном случае обнаруживают по утрате исходной инсерции (в данном случае образуется генотип *his3*⁻), путем приготовления реплик на подходящей среде.

И наконец, еще один метод замещения гена, который мы рассмотрим в данной главе. Этот метод предусматривает использование 5-фтороротовой кислоты для селекции «замещенных» трансформантов. Дрожжи дикого типа чувствительны к 5-фтороротовой кислоте в концентрации 750 мкг/мл [53]. Устойчивые колонии формируются вследствие утраты функции *URA3*⁺ (помимо ряда других малопонятных причин). Устойчивость клеток *ura3*⁻ к 5-фтороротовой кислоте можно использовать в экспериментах по замещению генов (Ротстейн и др., неопубликованные наблюдения). В исходном штамме дрожжей *ura3*⁻ интересующий ген нарушают, вводя в него с использованием одноэтапной процедуры фрагмент, содержащий ген *ura3*⁺; получают урацилнезависимые клетки (рис. 3, В). Затем эти клетки трансформируют линеаризованной ДНК, содержащей желаемым образом измененный *in vitro* ген, и проводят селекцию трансформантов на устойчивость к 5-фтороротовой кислоте. Замещение гена окончательно подтверждается с помощью геномной блот-гибридизации.

Итак, некоторые из описанных процедур замещения гена предполагают использование доминантных инсерций для нарушения интересующего нас гена; собственно замещение гена на изучаемый фрагмент сопровождается удалением инсерции и одновременной экспрессией рецессивного хромосомного аллеля. Следует, однако, заметить, что подобное изменение фенотипа клетки может обусловиться не только замещением гена. Так, среди устойчивых к 5-фтороротовой кислоте колоний мы обнаружили несколько клонов, возникших в результате генной конверсии при рекомбинации *URA3*⁺ с гомологичной хромосомной мутацией *ura3*⁻. Вдобавок мы обнаружили новые мутации *ura3*⁻ в инсерции *URA3*⁺. Такого рода события могут обуславливать заметный вклад в образование устойчивых колоний, если эффективность трансформации оказалась низкой. В этом плане

весьма желательно проверять с помощью геномной блот-гибридизации, произошло ли действительно замещение гена или изменение фенотипа связано с другими, «фоновыми» событиями.

Благодарности

Автор благодарит Брайана Гэлли, Барбару Томас и Джона Уоллиса за критический анализ рукописи, Ирвина Джелмана за подготовку фотографий и Луиса Перселла за машинописные работы. Автор также выражает признательность Кэрол Ньюлон, Киму Назмиту и Джерри Финку, любезно предоставившим свои неопубликованные данные. Работа субсидировалась грантами NIH и NSF.

Литература

1. Kramer R. A., Cameron J. F., Davis R. W. Cell, 8, 227 (1976).
2. Beckmann J., Johnson P., Abelson J. Science, 196, 205 (1977).
3. St. John T. P., Davis R. W. Cell, 16, 443 (1979).
4. Ratzkin B., Carbon J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 487 (1977).
5. Struhl K., Cameron J. R., Davis R. W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 1471 (1976).
6. Hinnen A., Hicks J., Fink G. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978).
7. Beggs J. D. Nature, 275, 104 (1978).
8. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular Cloning, published by Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982.
9. Paterson B. M., Roberts B. E., Kuff E. L. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 4370 (1977).
10. Clarke L., Hitzeman R., Carbon J. In: Methods in Enzymology, Wu R. (ed.), Academic Press Inc., New York, Vol. 68, p. 436 (1979).
11. Young R. A., Davis R. W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 1194 (1983).
12. Young R. A., Davis R. W. Science, 222, 778 (1983).
13. Goto T., Wang J. C. Cell, 36, 1073 (1984).
14. Hereford L., Fahvner K., Woolford J., Rosbash M., Kaback D. B. Cell, 18, 1261 (1979).
15. Holland M. J., Holland J. P., Jackson K. A. In: Methods in Enzymology, Wu R. (ed.), Academic Press Inc., New York, Vol. 68, p. 408 (1979).
16. DeFeo-Jones D., Scolnick E., Koller R., Dhar R. Nature, 306, 707 (1983).
17. Hicks J., Fink G. R. Nature, 269, 265 (1977).
18. Andreadis A., Hsu Y.-P., Kohlwass G. B., Schimmel P. Cell, 31, 319 (1982).
19. Bach M.-L., Lacroute F., Botstein D. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 386 (1979).
20. Stinchcomb D. T., Struhl K., Davis R. W. Nature, 282, 39 (1979).
21. Appleyard R. K. Genetics, 39, 440 (1954).
22. Yanofsky C., Horn V., Bonner M., Stasiowski S. Genetics, 69, 409 (1971).
23. Struhl K., Stinchcomb D. T., Scherer S., Davis R. W. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1035 (1979).
24. Orr-Weaver T. L., Szostak J. W., Rothstein R. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 6358 (1981).
25. Rothstein R. In: Methods in Enzymology, Wu R., Grossman L. and Moldave K. (eds.), Vol. 101, p. 202 (1983).
26. Schild D., Konforti B., Perez C., Gish W., Mortimer R. K. Curr. Genet., 7, 85 (1983).

27. McKay V. L. In: *Methods in Enzymology*, Wu R., Grossman L. and Moldave K. (eds.), Vol. 101, p. 325 (1983).
28. Tschumper G., Carbon J. *Gene*, **23**, 221 (1983).
29. Broach J. R., Li Y., Wu L. C., Layaram M. In: *Experimental Manipulation of Gene Expression*, Inouye M. (ed.), Academic Press, Inc., New York, p. 83, 1983.
30. Clarke L., Carbon J. *Nature*, **287**, 504 (1980).
31. Szostak J. W., Balckburn E. H. *Cell*, **29**, 245 (1982).
32. Murray A. W., Szostak J. W. *Nature*, **305**, 189 (1983).
33. Ammerer G. In: *Methods in Enzymology*, Wu R., Grossman L., Moldave K., Academic Press Inc., New York, Vol. 101, p. 192 (1983).
34. Kramer R. A., DeChiara T. M., Schaber M., Hilliker S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 367 (1984).
35. Brake A. J., Merryweather J. P., Coit D. G., Heberlein U. A., Masiarz F. R., Mullenbach G. T., Urdea M. S., Valenzuela P., Barr P. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4642 (1984).
36. Broach J. R., Strathern J. N., Hicks J. B. *Gene*, **8**, 121 (1979).
37. Stinchcomb D. T., Mann C., Davis R. W. *J. Mol. Biol.*, **158**, 157 (1982).
38. Ito H., Fukuda Y., Murata K., Kimura A. *J. Bacteriol.*, **15**, 163 (1983).
39. Klebe R. J., Harris J. V., Sharp Z. D., Douglas M. G. *Gene*, **25**, 333 (1983).
40. Orr-Weaver T. L., Szostak J. S., Rothstein R. J. In: *Methods in Enzymology*, Wu R., Grossman L., Moldave K. (eds.), Academic Press Inc., New York, Vol. 101, p. 228 (1983).
41. Grunstein M., Hogness D. S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3961 (1975).
42. Laskey R. A., Mills A. D. *FEBS Lett.*, **82**, 314 (1977).
43. Rigby P. W., Dieckmann R., Rhodes C., Berg P. J. *Mol. Biol.*, **113**, 237 (1977).
44. Cryer D. R., Eccleshall R., Marmur J. *Methods Cell Biol.*, **12**, 39 (1975).
45. Davis R. W., Thomas M., Cameron J. R., St. John T. P., Scherer S., Padgett R. A. In: *Methods in Enzymol.*, Gross L. and Moldave K. (eds.), Academic Press Inc., New York, Vol. 65, p. 404 (1980).
46. Stiles J. I., Szostak J. W., Young A. T., Wu R., Consul S., Sherman F. *Cell*, **25**, 277 (1981).
47. Orr-Weaver T. L., Szostak J. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4417 (1983).
48. Heffron F., So M., McCarthy B. J. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **43**, 1279 (1978).
49. Shortle D., Haber J. E., Botstein D. *Science*, **217**, 371 (1982).
50. Scherer S., Davis R. W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3912 (1979).
51. Struhl K. *Gene*, **26**, 231 (1983).
52. Siliciano P. G., Tatchell K. *Cell*, **37**, 969 (1984).
53. Boeke J. D., Lacroute F., Fink G. R. *Mol. Gen. Genet.* (1984), in press.
54. Smith M. M., Murray K. J. *Mol. Biol.*, **169**, 641 (1983).

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ИНЖЕНЕРИЯ РАСТЕНИЙ

Конрад Лихтенштейн, Джон Дрейпер

1. Введение

Долгое время растения не использовались в качестве объекта молекулярно-биологических исследований. Это обусловлено, главным образом, их слабой генетической изученностью. И именно глубокое, полное знание генетики дрозофилы сделало плодовую мушку излюбленным объектом для молекулярных биологов. Значительные научные силы привлечены к работе на животных системах, поскольку такие исследования прямо связаны с проблемами рака и наследственных болезней человека. Это привело к появлению векторов для молекулярного клонирования на основе вирусов животных, которые позволяют трансформировать культивируемые клетки млекопитающих. Следует, однако, заметить, что по сравнению с животными растения (как объект) имеют одно важное преимущество, а именно — легкость, с которой недифференцированную растительную соматическую ткань можно заставить дифференцироваться *in vitro* и сформировать фертильное растение. Эта отличительная черта растений позволяет изучать экспрессию генов, заново введенных в целый организм. Кроме того, она дает в руки селекционеров новую технологию, которая предполагает генетическое улучшение важнейших сельскохозяйственных культур и, таким образом, дополняет классические методы селекции растений.

Итак, благодаря развитию в самое последнее время методов трансформации растений назревает (или уже назрела) новая молекулярно-генетическая «революция». В разд. 2 данной главы мы рассмотрим современные векторы, предназначенные для введения чужеродных клонированных генов в растения. Несмотря на то что было предложено большое разнообразие векторов на основе растительных вирусов, к настоящему времени ни один из них детально не разработан. Среди возможных кандидатов — векторы на базе содержащих одноцепочечную ДНК вирусов из группы Gemini, вирусов с двухцепочечной ДНК из группы Caulimovirus (инфицирующих Brassicae) и вируса табачной мозаики с одноцепочечным РНК-геномом. Эти векторы характеризуются рядом недостатков — в частности, узкой хозяйской специфичностью, ограничениями на размер вставки и нестабильностью. Последнее замечание связано с тем, что упомянутые вирусы реплицируются автономно и не интегрируются в ядер-

ный геном растительных клеток. Указанные причины заставили нас сконцентрировать внимание на векторах, сконструированных на основе опухолеродных, так называемых Ti-плазмид (Ti — от англ. tumor inducing) *Agrobacterium tumefaciens*. Этот почвенный микроорганизм — поистине генный инженер: инфицируя растения, он вводит в их клетки фрагменты ДНК Ti-плазмид (Т-ДНК), которые интегрируются в ядерный геном и в дальнейшем экспрессируются. Векторы на основе Ti-плазмид выгодно отличаются широкой хозяйской специфичностью: они способны инфицировать большинство двудольных растений. Кроме того, для них, по-видимому, не характерны ограничения на размер чужеродной ДНК.

В разд. 3 мы коснемся вопросов, связанных с использованием векторов на базе Ti-плазмид, для трансформации растений. Здесь будут обсуждаться методы трансформации растительных тканей *in planta* и *in vitro* (трансформация протопластов). В качестве модельной системы мы выбрали трансформацию табака и других видов *Nicotiana*. Это связано с тем, что данные растения оказались наиболее удобными в плане работы с культурами тканей, в частности для получения жизнеспособных протопластов, из которых можно регенерировать целое растение. Недостаточное развитие методов культивирования тканей остается пока главным препятствием для проведения генно-инженерных работ с другими важными сельскохозяйственными культурами. Поскольку Ti-плазмидные векторы не могут использоваться для трансформации однодольных растений, мы включили альтернативные процедуры, которые позволяют вводить чужеродные гены в эти растения.

Раздел 4 посвящен современным методам выделения нуклеиновых кислот из растений. Эти процедуры необходимы при структурных и функциональных исследованиях чужеродных генов, введенных в растительную ткань, а также при конструировании геномных и кДНК-библиотек с целью клонирования и последующего изучения специфических генов растений. Эти гены часто идентифицируют, используя гетерологичные пробы, или в случае активных генов применяют методы, использующие высокую представленность соответствующих РНК в клетке. Поскольку многие из этих экспериментальных подходов хорошо известны и широко применяются в исследовательской практике, мы не будем их подробно касаться в данной главе. Исследования к настоящему времени растительные гены включают представителей мультигенных семейств, кодирующих основные запасные белки, которые экспрессируются в семенах (например, ген зеина кукурузы), растительные транспозоны и индуцируемые светом гены, участвующие в фотосинтезе (о последних достижениях в этой области см. [1]).

В заключительном разд. 5 мы обсудим различные методиче-

ские подходы, позволяющие изучать структуру и транскрипцию фрагментов чужеродной ДНК, интегрированных в растительные хромосомы. Здесь же будут представлены методики определения ферментов, которые кодируются генами, широко используемыми для трансформации растительных тканей.

2. Плазмидные векторы, позволяющие вводить чужеродные ДНК в растения

Как уже говорилось в предыдущем разделе, в настоящее время известно много методов, позволяющих осуществлять перенос генетического материала в клетки растений. Пожалуй, наиболее удачным и в то же время самым простым методом следует считать использование природной системы переноса генов *A. tumefaciens*. Результаты последних исследований в этой области освещены в работах [1, 2].

A. tumefaciens — это почвенная бактерия, способная инфицировать широкий круг голосеменных и двудольных покрытосеменных растений. Подвергшаяся инфекции поврежденная ткань пролиферирует, давая начало опухолевому разрастанию, известному под названием «корончатый галл». Индуцированная опухоль способна продолжать рост и в отсутствие бактерии-возбудителя. Трансформированная растительная ткань растет в аксенической культуре, не требуя гормонов — ауксинов и цитокининов, — в норме необходимых культивируемым растительным клеткам. (До недавнего времени это свойство сохранять ростовую активность в отсутствие фитогормонов являлось единственным селективным маркером трансформированной ткани.) Кроме того, трансформированная растительная ткань синтезирует одно или несколько специфических соединений, которые не обнаруживаются в нетрансформированной ткани. Эти вещества называются опидами (например, октопин и нопалин); они могут специфически метаболизироваться бактериями — возбудителями опухоли. Все эти функции кодируются большими Ti-плазмидами *A. tumefaciens*, из которых наиболее хорошо изучены октопиновые и нопалиновые Ti-плазмиды. На рис. 1 приведены генетические карты этих плазмид. Специфический участок плазмидной ДНК, обозначенный как Т-ДНК, переносится в ядро инфицируемой растительной клетки. Блот-гибридизационные эксперименты по Саузерну показали, что Т-ДНК интегрируется в ядерный геном. Аналогичные гибридизационные эксперименты с иммобилизованными на фильтре РНК (нозерн-блоттинг) продемонстрировали, что интегрированная Т-ДНК транскрибируется: в случае октопиновых Ti-плазмид было идентифицировано восемь полиаденилированных транскриптов, которые в сумме представляли 0,001% тотальной полиаденилированной мРНК

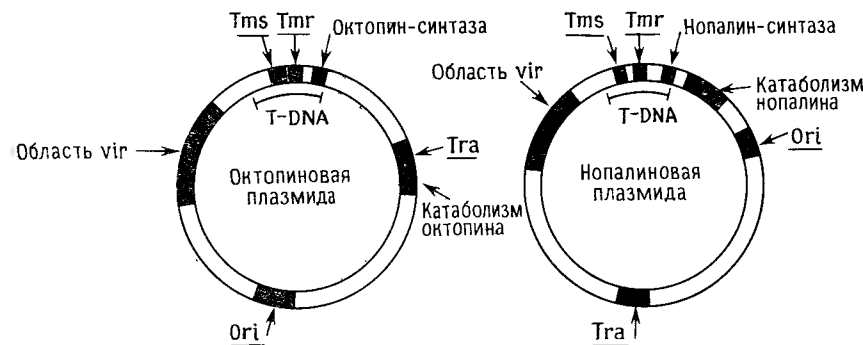


Рис. 1. Генетическая карта октопиновой (слева) и нопалиновой (справа) Ti-плазмид. Показана область Т-ДНК; здесь картированы гены, направляющие синтез октопина и нопалина, а также гены, определяющие морфологию опухолей. Эти гены удалось идентифицировать при изучении *rooty(tmr)*- и *shooty(tms)*-мутантов. В плазмидах обоих типов участок слева от Т-ДНК определяет их вирулентность и способность индуцировать опухоли. За пределами Т-ДНК расположены также гены, ответственные за катаболизм октопина, нопалина и других опинов.

растительных клеток. Поскольку транскрипция Т-ДНК ингибируется α -аманитином, считается, что этот процесс осуществляет РНК-полимераза II. Анализ первичной последовательности Т-ДНК выявил открытые рамки считывания, коррелирующие с этими транскриптами; самим транскриптам предшествуют последовательности ТАТА и в некоторых случаях СААТ, а заканчиваются они последовательностями ААТААА. Первые две из перечисленных последовательностей принято связывать с участками инициации транскрипции у большинства эукариот, а последовательность ААТААА, по предположению, служит сигналом полиаденилирования транскриптов. Картирование с помощью экзонуклеазы S1 подтвердило, что все эти последовательности расположены надлежащим образом относительно начала и конца транскриптов Т-ДНК. Генетический анализ с использованием транспозониндуцируемых мутаций и делеций выявил в составе Т-ДНК четыре локуса, которые коррелируют с открытыми рамками считывания. Локус *ocs* кодирует фермент октопин-синтазу. Локус *tmr* кодирует фермент, участвующий в биосинтезе цитокинина [3]. Мутации по этому локусу проявляются в интенсивном разрастании корней из индуцированной опухоли (*rooty*-мутанты). Локусы *tms1* и *tms2* кодируют ферменты, вовлеченные в биосинтез ауксина [4]. Мутации по любому из этих локусов вызывают пролиферацию побегов из опухоли (*shooty*-мутанты). Эффекты, обусловленные изменением уровня ауксинов и цитокининов и наблюдаемые на опухолях, индуцированных мутантной Т-ДНК или Т-ДНК дикого типа, анало-

гичны тем, которые имеют место при культивировании *in vitro* нетрансформированных тканей при различных концентрациях в среде ауксинов и цитокининов.

Механизм переноса Т-ДНК в геном клетки до конца не выяснен. Известно лишь, что Т-ДНК фланкирована почти полными повторами длиной 25 п.н. Предполагают, что именно эти последовательности ответственны за встраивание Т-ДНК в растительный геном, поскольку в интегрированной форме Т-ДНК ограничена участками, которые в составе плазмиды соседствуют с концевыми повторами. Удаление правой концевой зоны Т-ДНК путем делеционного мутагенеза Ti-плазмиды выключало перенос Т-ДНК в геном. В том же случае, когда в делетированный участок вводили синтетический олигонуклеотид, идентичный по последовательности концевому 25-нуклеотидному повтору Т-ДНК, ее вирулентность и способность интегрироваться в геном восстанавливалась. Это наблюдалось только тогда, когда синтетическая последовательность была клонирована в той же ориентации, что и последовательность дикого типа [5].

Перенос Т-ДНК в геном растительной клетки связан с функционированием и некоторых других генетических локусов. Это, например, протяженный (около 50 т.п.н.) участок, называемый областью *vir*, который содержит большое количество генов и в составе Ti-плазмиды картируется на достаточном удалении от Т-ДНК. Мутации любого гена, входящего в данный кластер, блокируют перенос Т-ДНК и, следовательно, лишают ее вирулентности. Недавно было показано, что некоторые из этих генов не экспрессируются до тех пор, пока бактериальные клетки не приходят в контакт с растительной тканью; это с равным успехом может быть как непосредственный контакт клеток, так и контакт, опосредованный диализной мембраной [6]. Индуцирующий экспрессию этих бактериальных генов растительный фактор пока не идентифицирован. Ряд хромосомных мутаций *A. tumefaciens* также лишает эту бактерию вирулентности. Предполагают, что соответствующие гены обеспечивают взаимодействие *A. tumefaciens* с растительной тканью в ходе инфекционного процесса.

Ti-плазмиды несут гены, обеспечивающие их конъюгативный перенос в невирулентные штаммы *Agrobacterium*. В норме эти гены не экспрессируются — их экспрессию запускает опин, продуцируемый в растительной ткани. Иными словами, опин действует как молекулярный «возбудитель», активирующий одновременно гены, участвующие в конъюгативном переносе генетического материала, и гены, обеспечивающие катаболизм опинов. Таким образом, Ti-плазмиды выработали весьма удачную стратегию эволюционного выживания. В инфицированной растительной ткани образующийся каллус пролиферирует и вырабатывает опины, которые *Agrobacteria*, несущие Ti-плазмиды,

могут метаболизировать, используя в качестве источника углерода и азота; кроме того, эти бактерии приобретают способность передавать Ti-плазмиды другим невирулентным штаммам *Agrobacteria*, которые не содержат Ti-плазмид.

Высокая эффективность переноса Т-ДНК в растительные ткани при инфекции, а также способность Т-ДНК переносить в своем составе чужеродные фрагменты ДНК делают Ti-плазмиды очень удобным вектором для введения ДНК в геном растительной клетки. Уже имеется опыт подобного переноса фрагментов чужеродной ДНК величиной до 50 т. п. н. [7]. Ограничения на размер вводимой ДНК пока не определены.

Основное неудобство в использовании Ti-плазмид связано с тем, что эти плазмиды вызывают у растений опухоли. Было бы желательно трансформировать растительные ткани чужеродной ДНК таким образом, чтобы это не сопровождалось развитием опухоли, так как из опухолевой ткани трудно регенерировать нормальное растение. С этой целью на основе Ti-плазмид были созданы векторы, имеющие делецию в области *onc* (гены *tms1*, *tms2* и *tmr*), но сохраняющие граничные последовательности, обеспечивающие перенос Т-ДНК. Поскольку в этом случае инфицированная ткань сохраняет зависимость от фитогормонов, в состав векторов введены селективные маркеры — гены, обеспечивающие устойчивость растения к антибиотикам. Так, например, канамицин и метотрексат весьма токсичны для растений, и гены, детерминирующие устойчивость к этим агентам, оказались удобными доминантными селективными маркерами. Другие бактериальные антибиотики гораздо менее токсичны для растений и потому не могут использоваться в селекции. Гены лекарственной устойчивости бактериального происхождения не располагают специфическими чертами строения эукариотических генов, которые бы способствовали их успешной транскрипции в растительной ткани. Поэтому были сконструированы гибридные гены, которые содержат промоторы, функционирующие в растительных клетках; кодирующие зоны этих генов завершаются сигнальным блоком ААТААА, необходимым для полиаденилирования эукариотических транскриптов. Наиболее популярным промотором, используемым в подобных конструкциях, стал промотор Ti-плазмидного гена нопалин-синтазы. Этот ген обладает самой высокой транскрипционной активностью среди всех генов Т-ДНК и конститутивно экспрессируется в самых разных растениях. Описанные конструкции обеспечивают экспрессию в растениях фенотипа устойчивости к антибиотику и тем самым позволяют проводить селекцию трансформированной ткани.

Конструирование на базе Ti-плазмид векторов, содержащих селективные маркеры, стало основой исследовательских программ многих лабораторий в разных странах мира, поэтому не исключено, что многие векторы, обсуждаемые в данной главе,

в скором времени отойдут на второй план, уступив место новым улучшенным конструкциям.

Предлагаемые вниманию читателя векторные системы призваны проиллюстрировать все многообразие технологических приемов, разработанных для введения чужеродной ДНК в растения. Эти методы предполагают использование арсенала средств рекомбинантной технологии и проверку новых конструкций путем быстрой и эффективной трансформации ими клеток *E. coli*. Проверенные конструкции затем можно вводить в *A. tumefaciens* с использованием конъюгации или трансформации, чтобы в конце концов ввести их в растительные клетки. Из-за большого размера Ti-плазмид непосредственно клонировать в них фрагменты чужеродной ДНК не представляется возможным. Для преодоления этой трудности предложено два альтернативных способа. Согласно одному из них, используется «разоруженная» (т. е. неонкогенная) Ti-плазида, в составе которой находится копия рВR322, фланкированная граничными последовательностями Т-ДНК. Любая последовательность ДНК, клонированная в рВR322, может быть интегрирована в такую Ti-плазмиду (в область, расположенную между граничными последовательностями) благодаря гомологичной рекомбинации между последовательностями ДНК рВR322. При инфицировании растительных клеток вся ДНК, заключенная между граничными последовательностями, переносится в хромосомы этих клеток.

Второй путь основан на использовании двух плазмид. Одна из них представляет собой вектор, способный реплицироваться в *E. coli* и *A. tumefaciens*; вектор содержит граничные последовательности Т-ДНК, фланкирующие селективный маркер и сайт клонирования. Эту плазмиду вводят в клетки *Agrobacterium*, содержащие вспомогательную Ti-плазмиду (или плазмиду-помощник), которая имеет большую делецию, включающую Т-ДНК, но сохраняет область *vir*. Транс-комплементация затем обеспечивает перенос ДНК, заключенной между граничными последовательностями векторной плазмиды, в ядерный геном растительной клетки.

Поскольку *A. tumefaciens* не способен инфицировать однодольные растения, например хлебные злаки, Ti-плазмиды нельзя использовать для их трансформации. Вот почему мы включили в обсуждение альтернативные методы трансформации этих растений. Недавно появилось сообщение о том, что лилия и нарцисс могут инфицироваться Ti-плазмидами; этот вывод был сделан на основании того факта, что в инфицированной растительной ткани экспрессируются опины [8]. Однако пока не удалось продемонстрировать устойчивое наследование чужеродных генов у этих растений. Поэтому представляется целесообразной разработка векторов для трансформации однодольных на базе вирусов растений. Подобные векторы были бы анало-

гичны векторам для трансформации животных на основе SV-40 и включали бы вирусную область начала репликации и селективный маркер.

2.1. Челночные векторы и акцепторные векторы на базе Ti-плазмид для переноса чужеродного генетического материала в растения

2.1.1. Опс⁻-векторы

Как уже говорилось во вступительном разделе настоящей главы, эти векторные системы созданы на основе неонкогенных Ti-плазмид. Акцепторный вектор pGV3850 [9] представлен на рис. 2. Он сконструирован на базе Ti-плазмиды нопалинового типа pTiC58 и имеет следующие характерные черты.

1. Он содержит граничные последовательности Т-ДНК и целиком внешние прилежащие области Ti-плазмиды.

2. В состав этого вектора рядом с правой граничной последовательностью входит участок Т-ДНК, кодирующий фермент нопалин-синтазу; соответствующая энзиматическая активность служит маркером для идентификации трансформированных клеток.

3. Внутренние гены Т-ДНК, определяющие ее онкогенность и препятствующие нормальной дифференцировке трансформированных растительных клеток, удалены.

4. Эти deletированные внутренние участки Т-ДНК заменены последовательностью ДНК вектора для молекулярного клонирования pBR322.

Присутствие ДНК pBR322 в составе pGV3850 делает этот вектор универсальным акцепторным вектором: любой ген, клонированный в плазмиде pBR322 или ее производных (выполняющих роль челночного вектора), может быть легко вставлен между граничными последовательностями Т-ДНК за счет гомологичной рекомбинации с образованием плазмидного коинтеграта. Челночный вектор нетрудно передать из *E. coli* в *A. tumefaciens* путем конъюгации (разд. 2.2). Поскольку pBR322 и ее производные не способны реплицироваться в клетках *A. tumefaciens*, отбор кроссверов проводится по устойчивости к антибиотику, кодируемой соответствующим геном челночного вектора. В разд. 2.3 описан быстрый метод анализа природы полученного коинтеграта.

Тип применяемого челночного вектора зависит от того, какой ген планируется ввести в растение. Созданные на сегодняшний день конструкции включают плазмиды семейства pBR322, в которые введен промотор гена нопалин-синтазы (*nos*), состыкованный с кодирующей областью одного из следующих генов: *ocs* (октопин-синтаза из Ti-плазмиды октопинового типа), *nrfl*

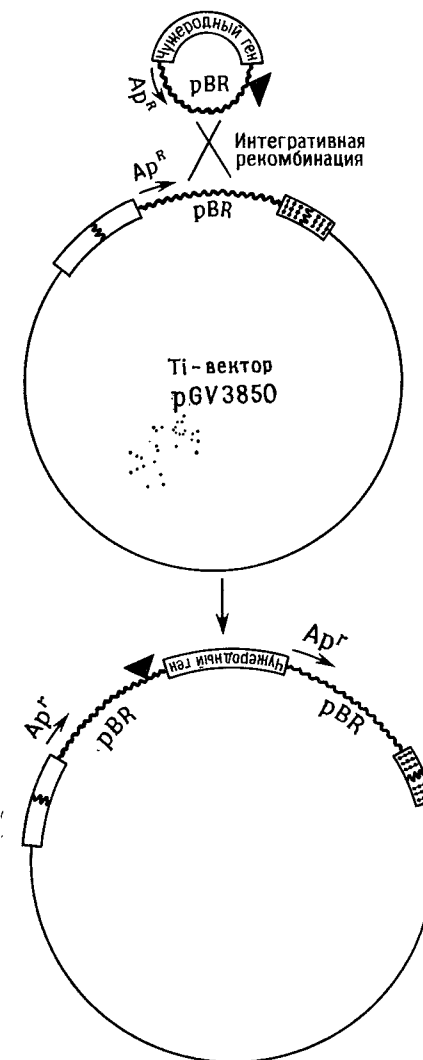


Рис. 2. Использование Ti-плазмидного вектора pGV3850 для экспрессии в растительных клетках чужеродных генов. Сначала интересующий ген клонируют в векторе типа pBR322 в *E. coli*. Эту плазмиду затем мобилизуют в *Agrobacterium*. Происходит коинтеграция рекомбинантной плазмиды, несущей интересующий ген, в pGV3850. Зачерненным треугольником показан ген лекарственной устойчивости, отличный от гена устойчивости к карбенициллину. ДНК pBR322 (волнистая линия) в составе pGV3850 фланкирована Т-ДНК, содержащей левую и правую граничные последовательности и ген *nos*. (Воспроизводится с любезного разрешения авторов работы [9].)

(неомицин-фосфотрансфераза II, ген канамициновой устойчивости из транспозона Tn5), *dhfr* (дигидрофолатредуктаза), гена устойчивости к метотрексату из плазмиды R67 и *cat* (хлорамфеникол-ацетилтрансфераза, ген устойчивости к хлорамфениколу, исходно выделенный из транспозона Tn9). Эти векторы содержат также последовательности ДНК из некодирующих 3'-концевых областей *nos*- или *ocs*-генов, локализующиеся у 3'-конца кодирующей зоны гибридного гена. Такие последовательности призваны обеспечить правильный сплайсинг и поли-

аденилирование образующегося транскрипта [7, 10, 11—13]. Кодированная область бактериального происхождения позволяет проводить селекцию трансформантов по устойчивости к антибиотикам. Недавно Эррера-Эстрелья с сотр. [13] состыковали промотор ядерного гена малой субъединицы рибулозодифосфат—карбоксилазы (*ss Rubisco*) гороха с кодирующей областью гена *cat* и продемонстрировали светоиндуцируемую экспрессию этого гена при введении его в *Nicotiana tabacum*.

Если ставится задача ввести в какую-нибудь сельскохозяйственную культуру ген, обуславливающий новый, ценный в хозяйственном отношении признак, следует использовать челночный вектор, который обладает следующими свойствами.

1. Он должен содержать последовательность ДНК pBR322 или другой плазмиды из этого семейства, которая могла бы обеспечить коинтеграцию рекомбинантной конструкции в акцепторный вектор pGV3850 (см. выше).

2. Такой вектор должен иметь кодирующую область гена *nptII*, состыкованную с *nos*-промотором для того, чтобы стала возможной селекция трансформантов по устойчивости к канамицину. Однако при таком слиянии теряется последовательность Шайна-Далгарно, и образовавшаяся конструкция не экспрессируется в прокариотах.

3. Следовательно, вектору необходим альтернативный селективный маркер, который экспрессировался бы в бактериальных клетках и позволял проводить селекцию трансформантов *E. coli* и в дальнейшем — селекцию коинтеграгов в *A. tumefaciens*. Для этой цели подходит, например, ген *Km^r* из Tn903 (*nptI*); этот ген не обнаруживает заметной гомологии с *nptII* и, следовательно, не может провоцировать делецию плазмидной ДНК за счет гомологичной рекомбинации.

Векторная система, удовлетворяющая всем перечисленным требованиям, была недавно создана [14]. Эта плазида, получившая обозначение pLVG neo 1103, показана на рис. 3. Она содержит единственный *EcoRI*-сайт для клонирования интересующего гена.

Исследователь может поставить перед собой и другую задачу — изучить некий индивидуальный растительный ген в плане регуляции его экспрессии и ее взаимосвязи с тканевой специфичностью, стадией развития растения, ее возможную светозависимость, реакцию на повреждение или инфекцию растения патогеном. Такой ген может быть выделен из растения, выращенного в специфических условиях, либо из специфической ткани путем клонирования кДНК, и его продукт может быть неизвестен. В этом случае целесообразно заменить кодирующую область данного гена на соответствующую область другого гена, для которого известен продукт и разработаны способы его идентификации. В качестве примера можно привести ген хлорамфе-

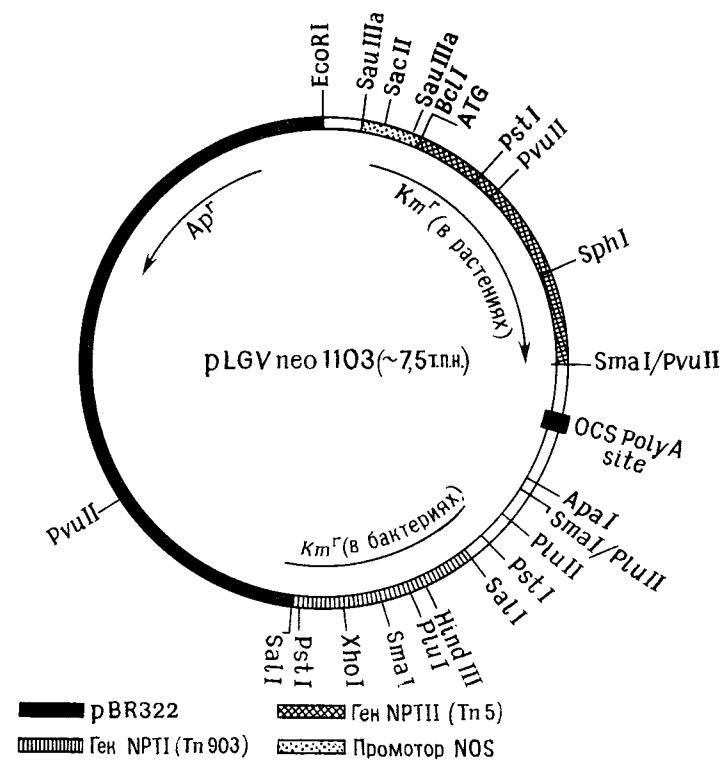


Рис. 3. Рестрикционная карта pLVG neo 1103. Этот челночный вектор при коинтеграции в —pGV3850 обеспечивает селекцию канамициноустойчивых растительных трансформантов. (С любезного разрешения L. Herrera-Estrella.)

ник-ацетилтрансферазы (CAT) из бактериального транспозона Tn9. Пока еще активность CAT не может служить надежным селективным маркером при работе с растительными объектами, однако для работы с животными системами CAT-тест уже разработан и широко применяется (см. гл. 6). Кодированную область гена CAT можно выделить в виде *SauIIIa*-фрагмента из плазмиды pBR325. Измерение активности CAT дает возможность грубо оценивать транскрипционную активность растительного промотора. Делеционный мутагенез, направленный на 5'- и 3'-концевые некодирующие зоны этой рекомбинантной конструкции, позволяет установить, какие домены в последовательности ДНК отвечают за модуляцию транскрипционной активности.

Конструирование рекомбинантных плазмид детально описано [15], и здесь мы не будем касаться этого вопроса. Лигированный материал используют для трансформации *E. coli* (штамм HB101) с последующей селекцией по устойчивости к соответ-

ствующему антибиотику. Проверку плазмидных конструкций осуществляют путем рестрикционного картирования ДНК, выполненной в аналитических количествах из ряда независимых трансформантов. Получив подтверждение, можно планировать эксперименты по коинтеграции полученной конструкции в рGV3850 в *A. tumefaciens*. Соответствующие процедуры описаны в разд. 2.2.

2.1.2. *onc*⁺-векторы

Векторная система рGV3850, описанная в предыдущем разделе, относится к *onc*⁻-системам и, следовательно, более всего подходит для работ, связанных с изучением экспрессии чужеродных генов в интактных растениях, регенерированных из культур каллуса, или для генно-инженерных экспериментов, направленных на улучшение потребительских свойств сельскохозяйственных растений. Однако в определенных случаях представляет интерес исследование экспрессии чужеродных генов в корончатых галлах, и для этих целей необходимы *onc*⁺-векторы. Преимущество этих систем заключается в том, что в активно пролиферирующей ткани корончатых галлов трансформантов можно гораздо легче и быстрее обнаружить благодаря гормоннезависимому фенотипу (подробнее см. в разд. 3).

Рассмотрим два акцепторных *onc*⁺-вектора, аналогичных вектору рGV3850. Один из них — рGV3851 [16] имеет меньшую по размеру делецию внутри зоны Т-ДНК, чем рGV3850, левый внутренний участок Т-ДНК отсутствует и замещен последовательностью ДНК рBR322, а правый, включающий ген *tmr*, сохранен. Эта плазмида обуславливает появление фитогормоннезависимых *shooty*-мутантов. Другой вектор — рМРG1 [17] — содержит в нопалин-синтазном гене из рTiC58 космидную вставку рНС79 (гомологичную рBR322). Эта плазмида вызывает у растений опухоли дикого типа *por*⁻.

2.1.3. *onc*⁺/*onc*⁻-векторы: система альтернативного переноса

Группа Монсанто [11] разработала векторную систему *onc*⁺/*onc*⁻. Этот вектор, созданный на базе Ti-плазмиды октопинового типа рTiB652, изображен на рис. 4. Он содержит две правые граничные последовательности. После совместного культивирования и селекции канамициноустойчивых растительных клеток (разд. 3) обнаруживаются два типа переноса генетического материала в растительный геном: переносится либо целиком гибридная Т-ДНК (ограниченная справа дистальной граничной последовательностью), либо Т-ДНК, лишенная опухолевых генов (ограниченная справа проксимальной граничной

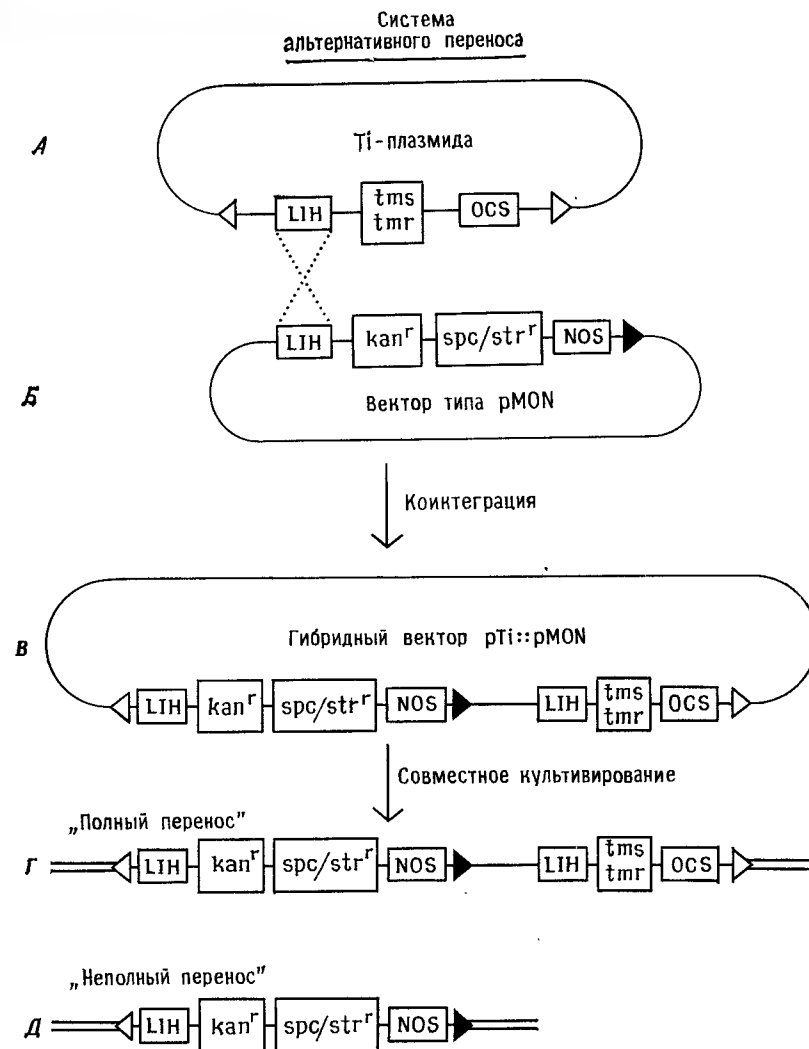


Рис. 4. Схема использования *onc*⁺/*onc*⁻-вектора для трансформации растительных клеток. Стрелками обозначены граничные последовательности Т-ДНК. *LIH* — участок гомологии, обеспечивающий возможность рекомбинации. Опухолевые гены представлены *tms* и *tmr* [11]; *OCS* и *NOS* — гены октопин- и нопалин-синтазы. Гибридный ген канамициновой устойчивости обозначен *kan^r*, бактериальный ген спектиномицин-стрептомициновой устойчивости (для селекции коинтеграторов) — *spc/str^r*. В результате реципрокной рекомбинации Ti-плазмиды (рTiB6S3) (А) и производной рMON120 (рMON128) (Б) образуется коинтеграция рTiB6S3::рMON128 (В). После совместного культивирования и селекции канамициноустойчивых растительных клеток в геноме последних обнаруживаются как полные гибридные Т-ДНК (Г), так и Т-ДНК, лишенные опухолевых генов (Д). (Воспроизводится с любезного разрешения авторов работы [12].)

последовательностью). В последнем случае соответствующие трансформанты могут быть регенерированы в интактное растение.

2.2. Перенос плазмид в *A. tumefaciens* путем конъюгации

Получив желаемую рекомбинантную конструкцию — введя интересующий ген X в плазмиду pBR322 или ее производную, как описано в разд. 2.1, — необходимо далее ввести эту конструкцию в *A. tumefaciens*. Поскольку pBR322 не способна реплицироваться в *A. tumefaciens*, достигнуть цели можно только путем интеграции рекомбинантной pBR322 в Ti-плазмиду pGV3850. Перенос новой конструкции из *E. coli* в *A. tumefaciens* осуществляется путем конъюгации.

Плазмиды семейства ColE1 (так же, как pBR322) сами по себе не трансмиссильны; их перенос может обеспечиваться по *транс*-схеме трансмиссильными плазмидами I α -типа, например R64drd11. Для конъюгации необходима также активность гена *tob* (кодируемого ColE1), продукт которого узнает специфическую сигнальную последовательность — *bot*-сайт. В этой области располагается точка инициации переноса. Плазмида pBR322 сохранила *bot*-сайт, однако функции *tob* для нее должна обеспечивать по *транс*-схеме вспомогательная плазмида. Этой цели отвечает плазмида pGJ28; она содержит как собственный *bot*-сайт, так и область *tob* и совместима с pBR322. Совместимость плазмид означает, что pGJ28 и pBR322 могут одновременно реплицироваться в одной и той же клетке *E. coli*. Таким образом, донорный штамм *E. coli*, содержащий pGJ28, R64drd11 и рекомбинантную pBR322, способен мобилизовать все три плазмиды в *A. tumefaciens*. R64drd11 нестабилен в клетках *A. tumefaciens*, а ни одна из двух других плазмид вообще не может реплицироваться в этом хозяине. Используя описанную систему, Ван-Хауте с сотр. [18] показали, что рекомбинантная pBR322 переносится в клетки реципиентного штамма с частотой $4,5 \cdot 10^{-3}$. В связи с тем что плазмида pBR322 не способна реплицироваться после переноса, в этих экспериментах использовалась гибридная конструкция: рекомбинантная pBR322 была встроена в нетрансмиссильный немобилизуемый плазмидный вектор, обладающий способностью реплицироваться в клетках *A. tumefaciens*. В случае использования рекомбинантной pBR322, содержащей участок ДНК Ti-плазмиды длиной 3,3 т. п. н., частота стабильной интродукции составляла $6,7 \cdot 10^{-6}$. Принимая частоту конъюгативного переноса равной $4,5 \cdot 10^{-3}$, получаем для частоты рекомбинационных событий величину $1,5 \cdot 10^{-3}$, что эквивалентно $0,5 \cdot 10^{-6}$ на одну пару оснований в зоне гомологии.

Рекомбинантная конструкция на основе pBR322, содержащая чужеродный ген X (pBR::X), сначала вводится в клетки

Таблица 1. Среда для культивирования бактерий

Количества веществ указаны в расчете на 1 л среды. Агаризованные среды готовят, добавляя агар (Difco) до 1,5%, если не указано отдельно. pH раствора доводят до 7,0 1 M NaOH.

Среда YEB

Дрожжевой экстракт (Oxoid)	1 г
Мясной экстракт (Lab Lemco, Oxoid)	5 г
Пептон (Difco)	5 г
Сахароза	5 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 г

Среда LB

Бактотриптон (Difco)	10 г
Дрожжевой экстракт (Difco)	5 г
NaCl	10 г

Среда NB

Питательный бульон (Difco)	8 г
----------------------------	-----

Среда AB

	20-кратный	1-кратный
Раствор I		
K ₂ HPO ₄	60 г	3 г
NaH ₂ PO ₄	20 г	1 г
Раствор II		
NH ₄ Cl	20 г	1 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	6 г	0,3 г
KCl	3 г	0,15 г
CaCl ₂	3 г	0,01 г
FeSO ₄ ·7H ₂ O	50 мг	2,5 мг

20-кратные растворы I и II автоклавируют отдельно, смешивают необходимые количества, разбавляют до 1-кратной концентрации и вносят глюкозу до 0,5%.

Среда SM

K ₂ HPO ₄	2,05 г
KH ₂ PO ₄	1,45 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 г
NaCl	0,15 г
CaCl ₂	0,02 г
(NH ₄) ₂ SO ₄	3,0 г
Глюкоза	4,0 г

Жидкая среда SM для конъюгации

Идентична SM, но дополнительно содержит	
FeSO ₄	0,001 г
MgSO ₄	0,001 г

Среда SMNO (не содержит азотистых соединений)¹⁾

K ₂ HPO ₄	10,25 г
KH ₂ PO ₄	7,25 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,50 г
NaCl	0,15 г
CaCl ₂	0,02 г
Октопин (или нопалин)	0,10 г
Глюкоза	2,00 г
NaOH	0,014 г
Бромфеноловый синий	0,15 г

Продолжение

Маннитол-глутаматная среда (MG)

Маннитол	10 г
Глутамат натрия	2,32 г
KH ₂ PO ₄	0,5 г
NaCl	0,2 г
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,2 г
Биотин	2 г

Среда LBMG

Среду готовят, смешивая равные объемы LB и MG

Буфер для разведения фага λ

Трис-HCl pH 7,4	10 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	10 mM

¹⁾ Для приготовления агаризованной среды SMNO необходимо предварительно промыть агар в бидистиллированной воде, чтобы удалить азотистые примеси. 15 г агара промывают в 1 л воды.

E. coli HB101 путем трансформации (в табл. 2 приведен список штаммов, используемых в описываемых методиках). Отсутствие других плазмид облегчает анализ трансформантов (см. разд. 2.1). Затем в этот же штамм HB101 (pBR322::X) вводят плазмиды pGJ28 и R64drd11 для того, чтобы в дальнейшем обеспечить конъюгативный перенос рекомбинантной конструкции в *A. tumefaciens*. Эту процедуру осуществляют путем конъюгации донорного штамма GJ23 (содержащего pGJ28 и R64drd11) и реципиентного HB101 (pBR322::X). Фенотип *recA* штамма HB101 препятствует гомологичной рекомбинации между pGJ28 и pBR322::X. Эксконъюгантов отбирают на чашках с LB-агаром в присутствии ампициллина, канамицина и стрептомицина. Концентрации антибиотиков в среде указаны в табл. 3. Эксконъюгантов, полученных в результате данного скрещивания, затем скрещивают с реципиентным штаммом *A. tumefaciens* GV3101 (pGV3850). Эксконъюгантов можно отбирать на чашках со средой АВ (табл. 1), обеспечивающей селекцию против донора и содержащей канамицин или любой другой антибиотик, устойчивость к которому кодируется конструкцией pBR322::X. Конъюгацию бактерий проводят по методике, описанной в табл. 4.

2.2.1. Триродительские скрещивания

Альтернативный способ введения рекомбинантной конструкции в *A. tumefaciens* предусматривает триродительское скрещивание. Этот метод достаточно прост; он основан на том, что конъюгативный перенос R64drd11 и pGJ28 из одного штамма *E. coli* в другой происходит чрезвычайно эффективно (около 50% реципиентов приобретает эти плазмиды). Методика за-

Таблица 2. Бактериальные штаммы и плазмиды

Штамм	Характеристика	Ссылка
<i>Штаммы E. coli</i>		
HB101	F ⁻ , r ⁻ _в , m ⁻ _в , <i>RecA</i> , <i>ara</i> , <i>proA</i> , <i>lacY</i> , <i>galK</i> , <i>str</i> , <i>xyl5</i> , <i>mtl</i> , <i>SupE</i>	[15]
GJ23	<i>RecA</i> -мутант AB115; содержит pGJ28 и R64drd11	[18]
JM83	K12, несущий интегрированный в геном ф 80 с <i>lacZ</i> ΔM15 (<i>ara</i> , Δ <i>lac-pro</i> , <i>strA</i> , <i>thi</i> , ф 80Δ <i>lacZ</i> ΔM15)	[38]
<i>Штаммы A. tumefaciens</i>		
A136	C58rif ^r , не содержащий Ti-плазмиду	[20]
LA4404	A136, содержащий pAL4404	[22]
GV3102	Эквивалент A136	[9]
<i>Плазмиды</i>		
pBR322	Ap ^r , Tc ^r	[15]
pGJ28	Km ^r , Nm ^r , Cda ⁺ , Ida ⁺ , ColD-репликон, несущий ColE1 <i>mob</i> и <i>bom</i>	[18]
R64drd11	Tc ^r , Sm ^r ; трансмиссибельная плаزمидα Iα-типа, дерепрессированная производная R64	[18]
pGV3850	Ap ^r <i>onc</i> ⁻ -производная нопалиновой плазмиды pGC3839, содержащая последовательности pBR322	[9]
pAL4404	Производная октопиновой плазмиды pTiAch5, имеющая делецию области T-ДНК	[22]
pLGVneo1103	Ap ^r , Km ^r , производная pBR322 с гибридным геном <i>pos-neo</i>	[14]
pRK2013	Km ^r ColE1-производная PK2 с <i>tra</i> -генами	[23]
pGV2215	Km ^r , <i>tms</i> -мутант Ti-плазмиды октопинового типа pTiB653	[16]
pGV3851	Ap ^r , <i>tms</i> ⁻ -производная нопалиновой Ti-плазмиды C48, содержащая последовательности pBR322	[16]
pMP61	Производная pGV3105 <i>Tra</i> ^c <i>pos</i> ^c <i>oss</i> ⁺ с инсерцией pHC79 в ген <i>pos</i>	[17]
pHC79	Космида Ap ^r , Tc ^r	[17]

ключается в следующем. Бактерии штаммов GJ23, HB101, (pBR322::X) и GV3101 (pGV3850) выращивают согласно методике 4. Затем культуры смешивают и инкубируют для осуществления конъюгативного переноса (см. табл. 4), после чего высеваяют на чашки со средой АВ (табл. 1), обеспечивающей отбор GV3101 (pGV3850) и содержащей канамицин для селекции pBR322::X.

Теперь эксконъюганты *A. tumefaciens* готовы для того, чтобы их анализировать на предмет коинтеграции pBR322::X и pGV3850. Соответствующие процедуры описаны в разд. 2.3. Штаммы, несущие стабильные коинтеграаты, следует поддерживать на средах, содержащих нужный антибиотик.

Таблица 3. Концентрации антибиотиков, используемых в работе с бактериями

Антибиотик	Сокращение	Концентрация (мкг/мл) для клеток:	
		<i>E. coli</i>	<i>A. tumefaciens</i>
Карбенициллин	<i>Cb</i>	200	100
Хлорамфеникол	<i>Cm</i>	30	—
Канамицин	<i>Kn</i>	50	50
Неомицин	<i>Nm</i>	50	50
Рифампицин	<i>Rif</i>	100	50
Спектиномицин	<i>Sp</i>	100	100
Стрептомицин	<i>Sm</i>	100	100
Тетрациклин	<i>Tc</i>	10	2,5

Таблица 4. Конъюгация бактерий

1. При помощи стерильной зубочистки захватите одиночные колонии донорного штамма и реципиентного штамма и нарастите бактериальные культуры отдельно в 5 мл среды LBMG¹⁾ в течение ночи на качалке до стационарной фазы. Штаммы *E. coli* для конъюгации можно инкубировать в среде LB при 37°C. Для *A. tumefaciens* более предпочтительна низкосолевая среда LBMG; оптимальная температура культивирования — 30°C, так как при более высокой температуре Ti-плазмиды нестабильны.

2. Смешайте по 0,1 мл донорной и реципиентной бактериальной культуры и сконцентрируйте клетки путем фильтрации через фильтр Millipore с размером пор 0,22 мкм.

3. Поместите фильтр на чашку со средой NA²⁾. Для скрещивания *E. coli* × *E. coli* чашки следует инкубировать при 37°C в течение 4–6 ч. Для скрещивания *E. coli* × *A. tumefaciens* чашки инкубируют в течение ночи при 30°C. (Конъюгацию *E. coli* × *E. coli* можно проводить и на чашках с LB-агаром.)

4. Ресуспандируйте клетки с фильтра в 1 мл фагового буфера для λ и высейте на подходящую селективную среду (например, на минимальную среду АВ, содержащую антибиотики для селекции эксконъюгантов и для определения титра донорных и реципиентных клеток). Эффективность переноса определяется как отношение числа эксконъюгантов к титру реципиентных клеток. Инкубируйте чашку в течение ночи при 37°C для скрещивания *E. coli* × *E. coli* или в течение 2–3 дней при 30° для скрещивания *E. coli* × *A. tumefaciens*.

5. Отберите и рассейте штрихами на селективной среде несколько колоний эксконъюгантов, чтобы получить индивидуальные клоны. Инкубируйте чашки либо в течение ночи при 37°C, либо в течение 2–3 дней в зависимости от вида бактерий.

¹⁾ Рецепт сред приведена в табл. 1.

²⁾ Среда NA представляет собой агаризованную (1,5%) среду NB (табл. 1).

2.2.2. Конъюгативный перенос Ti-плазмид

Представляется маловероятным, чтобы этот методический прием получил сколько-нибудь широкое распространение, поскольку многие векторы на основе Ti-плазмид уже введены в соответствующие штаммы *A. tumefaciens*. Однако не исключена вероятность того, что появится необходимость поместить данную Ti-плазмидную конструкцию в новое геномное окружение. Так как гены *tra*, активность которых необходима для конъюгативного переноса Ti-плазмид, находятся под негативным контролем, их надо дерепрессировать путем добавления индуктора. Для Ti-плазмид октопинового типа индуктором является октопин, а для нопалиновых Ti-плазмид — нопалин. Индуктор дерепрессирует также опероны, обеспечивающие катаболизм каждого из этих опинов. Следовательно, трансконъюгантов можно отбирать на средах, содержащих в качестве единственного источника азота соответствующий опин. Методика конъюгативного переноса [19] подробно описана в табл. 5.

2.3. Быстрое картирование коинтеграторов челночного вектора и Ti-плазмидного акцепторного вектора в *A. tumefaciens*

Осуществив мобилизацию челночного вектора на основе pBR322 из *E. coli* в *A. tumefaciens*, необходимо удостовериться в том, что этот вектор интегрировался в pBR322-содержащую область Т-ДНК Ti-плазмидного мутанта pGV3850. Электрофоретический анализ материала, обработанного рестрикционными эндонуклеазами, здесь малоэффективен, поскольку из-за большого размера Ti-плазмид (150–200 т. п. н.) образуется очень

Таблица 5. Конъюгативный перенос Ti-плазмид

1. Отберите одиночные колонии донорного штамма и реципиентного штамма бактерий и нарастите стационарные ночные культуры при 30°C и слабом покачивании в 5 мл среды SM с добавлением FeSO₄ и MnSO₄.

2. Разведите культуры 1:20 и инкубируйте в течение еще 6 ч, оптическая плотность при 600 нм (ОП₆₀₀) должна быть приблизительно равна 0,8 (2·10⁸ клеток/мл).

3. Аккуратно смешайте равные порции донорных и реципиентных клеток и по 0,2 мл смеси профильтруйте через нитроцеллюлозные фильтры, как это описано в табл. 4. Поместите фильтры со средой SM, содержащей 1 мг/мл MnSO₄ и 2 г/л октопина или нопалина (в зависимости от потребности). Инкубируйте чашки в течение 2–4 дней при 30°C.

4. Ресуспандируйте клетки с фильтров и высейте на селективные чашки, как описано в табл. 4¹⁾. Селекцию по способности утилизировать опин проводят на среде SMNO (табл. 1).

5. Рассейте колонии эксконъюгантов штрихами, как описано в табл. 4.

¹⁾ Селекция эксконъюгантов упрощается, если переносимая Ti-плазида содержит маркер лекарственной устойчивости. Например, pGV3850 несет детерминанту устойчивости к карбенициллину.

большое количество фрагментов и их трудно идентифицировать. Хорошие результаты в этом случае дает блот-гибридизация по Саузерну. Препаративное выделение Ti-плазмидной ДНК — занятие дорогое и весьма трудоемкое, поэтому проще выделить суммарную ДНК *A. tumefaciens* из 10–20 разных колоний, руководствуясь методикой 6. Эта методика, разработанная Фарфинкелем и сотр. [20] для картирования Ti-плазмидных мутантов, возникших в результате инсерции транспозонов, обеспечивает получение 3–6 мкг ДНК. ДНК можно обрабатывать подходящими рестрикционными эндонуклеазами (объем реакционной смеси 20 мкл, ДНК — 15 мкл). Следует также выделить ДНК из штамма *A. tumefaciens* GV3101, не содержащего Ti-плазмиду, и из штамма, имеющего родительскую плазмиду pGV3850. Кроме того, надо обработать рестриктазой ДНК pBR322::X.

Проведя рестриктазную обработку образцов ДНК, смешайте 1 нг ДНК плазмиды pBR322::X с ДНК, выделенной из GV3101. Эта модель будет приблизительно отражать наиболее вероятную копиюность плазмидной ДНК в анализируемых штаммах. Не забудьте о подходящем маркере молекулярной массы (например, ДНК фага λ , обработанная *Hind*III). Теперь препараты ДНК готовы для электрофоретического фракционирования в агарозном геле и последующего блот-гибридизационного анализа по Саузерну [16].

Альтернативным процедуре Саузерна методом является высушивание геля после окончания электрофореза. Его достоинством можно считать быстроту и дешевизну — можно не трагиться на нитроцеллюлозу или «Genescreen». ДНК в геле денатурируют и затем нейтрализуют точно так же, как в методике Саузерна. Потом гель помещают на два листа Whatman 3MM, покрывают лавсановой или поливинилхлоридной пленкой («Sarganwrap») и высушивают на вакуумной сушилке без нагрева (в противном случае гель может оплавиться). Хорошие результаты дает облучение геля инфракрасной лампой для ускорения сушки. После того как гель высохнет, его осторожно отделяют от бумажной подложки, промывают в 3–5-SSC (1×SSC: 0,3 М NaCl; 0,03 М цитрат натрия), чтобы удалить оставшиеся бумажные волокна, и далее используют для пре-гибридизации и собственно гибридизации с зондом. Для описанной процедуры желательнее при заливке геля применять тугоплавкую агарозу HGT (high gelling temperature): высушенный гель в этом случае отличается большей прочностью.

В качестве зонда используют ДНК челночного вектора, меченную *in vitro* путем ник-трансляции, и результаты гибридизации визуализируют с помощью радиоавтографии. Полученная картина распределения полос должна подтвердить факт интеграции челночной плазмиды в pGV3850. Штамм, обнаруживший

Таблица 6. Выделение ДНК из отдельных колоний *A. tumefaciens* для блот-гибридизационного анализа

1. Перенесите отдельную бактериальную колонию в 5 мл LBMG¹⁾ и инкубируйте при 30 °C на качалке в течение ночи до поздней логарифмической фазы.
2. Отберите по 1,5 мл в микроцентрифужные пробирки и осадите клетки центрифугированием в течение 5 мин.
3. Ресуспенсируйте осадок клеток в 380 мкл TE²⁾, добавьте 20 мкл 25%-ного SDS, 100 мкл 5 мг/мл проназы (предварительно выдержанной при 27 °C в течение 2 ч) и инкубируйте при 37 °C в течение 30 мин.
4. Добавьте 50 мкл 5 М NaCl и инкубируйте при 68 °C в течение 30 мин.
5. Экстрагируйте препарат равным объемом фенола, уравновешенного 100 мМ трис-HCl pH 8,0; 0,5 м NaCl.
6. Водную (верхнюю) фазу экстрагируйте равным объемом смеси фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (12:12:1).
7. Водную фазу экстрагируйте равным объемом смеси хлороформ:изоамиловый спирт (24:1).
8. Осадите ДНК, добавив к водной фазе два объема этанола (соль можно не добавлять). Охладите препарат до –70 °C в спиртовой бане с сухим льдом и соберите ДНК центрифугированием в микроцентрифуге.
9. Промойте осадок ДНК 70%-ным этанолом, высушите в вакууме и растворите в 200 мкл буфера³⁾.

¹⁾ Рецепт сред приведена в табл. 1.

²⁾ TE: 50 мМ трис-HCl pH 8,0; 20 мМ ЭДТА.

³⁾ Буфер для растворения ДНК: 10 мМ трис-HCl pH 8,0; 5 мМ NaCl; 1 мМ ЭДТА.

правильную гибридизационную картину, можно использовать для трансформации растительной ткани, как это описано в разд. 3.

2.3.1. Выделение Ti-плазмидной ДНК *A. tumefaciens*

Вполне вероятно, что для экспериментальных целей понадобится препарат ДНК Ti-плазмиды. Препаративное выделение Ti-плазмидной ДНК описано ранее [21]. Методика, представленная в табл. 7, — аналитическая процедура, позволяющая получить до 2 мкг плазмидной ДНК из 10 мл культуры. Выделенный препарат ДНК годится для обработки большинством известных в практике рестриктаз, но содержит следовые количества РНК.

2.4. Бинарные векторы для введения чужеродной ДНК в растения

Бинарные векторы были разработаны после того, как удалось установить следующий факт. Если область *vir* и область T-ДНК Ti-плазмиды находятся в двух разных плазмидных репликалах, *vir*-область, локализованная в одной плазмиде, способна комплементировать в *транс*-положении функцию переноса T-ДНК в растения. Преимущество бинарной системы по сравнению с системами, описанными в разд. 2.2, заключается в том,

3. В его состав будут входить правая и левая граничные последовательности октопиновой Ti-плазмиды для переноса ДНК в растения.

4. Указанные граничные последовательности будут фланкировать состыкованную область pos-neo для селекции растительных трансформантов, а также *HaeII*-фрагмент плазмиды pUC18, который содержит полилинкер в составе участка гена β -галактозидазы. Нуклеотидная последовательность полилинкера содержит множественные сайты рестрикции, удобные для клонирования интересующего гена. Следовательно, плазмидные рекомбинанты при выращивании на среде, содержащей изопропил-1-тио- β -D-галактозид (IPTG) и 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозид (X-gal), будут формировать белые колонии (как в случае векторов pEMBL, см. главу 5 в первом томе книги).

После того как получена гибридная конструкция, содержащая вектор переноса ДНК и интересующий ген X, ее необходимо передать из *E. coli* в *A. tumefaciens* путем конъюгации. Поскольку у вектора отсутствуют нужные функции, генетический перенос обеспечивается по *транс*-схеме плазмидой pRK2013 [23] в триродительском скрещивании, как описано в разд. 2.2.1. В подобном эксперименте в качестве двух донорных штаммов *E. coli* выступают HB101 (pRK2013) и JM83 (вектор переноса ДНК) (табл. 2). Реципиентом служит LA4404, содержащий pLA4404. Эксконъюгантов отбирают на минимальной среде AB (с селекцией против донора), содержащей канамицин для селекции вектора переноса ДНК. Плазида pRK2013 также несет ген устойчивости к канамицину, однако она не способна реплицироваться в *A. tumefaciens*. Новая конструкция теперь готова для трансформации растительной ткани.

2.4.1. Трансформация *A. tumefaciens* плазмидной ДНК

Альтернативный путь введения вектора переноса ДНК в штамм *A. tumefaciens*, несущий плазмиду pLA4404, заключается в его прямой трансформации. Соответствующие экспериментальные процедуры описаны в табл. 8.

3. Введение ДНК в растительные клетки и регенерация трансформированных растений

Методические подходы к трансформации высших растений с использованием векторных молекул ДНК были разработаны на протяжении нескольких последних лет. Эти работы явились естественным следствием открытия Ti-плазмид *A. tumefaciens* и выяснения их роли в этиологии растительных опухолей (корнчатых галлов) (см. разд. 2). Вирулентные агробактерии, несущие Ti-плазмиды, способны обеспечить перенос и интегра-

Таблица 8. Прямая трансформация *A. tumefaciens* плазмидной ДНК

1. Внесите отдельную колонию LBA4404¹⁾ в 5 мл среды LBMG или YEB и растите культуру при 30 °C в течение ночи на качалке.
2. Инокулируйте 200 мл свежей среды ночной культурой и инкубируйте в колбе на 1 л при 30 °C в течение 5–6 ч.
3. Центрифугируйте культуру в роторе Sorvall GSA (или эквивалентном) при 4000 об/мин в течение 5 мин. Затем ресуспендируйте клетки в 100 мл 10 mM трис-HCl pH 8,0.
4. Осадите клетки, как это описано в п. 3, и ресуспендируйте их в 12 мл YEB (или LBMG)²⁾.
5. Смешайте 200 мкл клеток и 100 мкл плазмидной ДНК (0,1–1,0 мкг) и поместите на 5 мин в спиртовую баню с сухим льдом (–70 °C).
6. Инкубируйте на водяной бане при 37 °C в течение 25 мин.
7. Добавьте 2 мл среды YEB (или LBMG) и инкубируйте при 30 °C на качалке в течение 1 ч.
8. Высейте 100 мкл клеток на чашку со средой LBMG, содержащей канамицин или другой антибиотик, устойчивость к которому кодируется плазмидной ДНК, использовавшейся для трансформации; инкубируйте чашку при 30 °C в течение 1–2 суток.
9. Отберите отдельные колонии и рассыйте их штрихами на той же селективной среде. Инкубируйте при 30 °C.

¹⁾ Описание штамма *A. tumefaciens* LBA4404 см. в табл. 2.

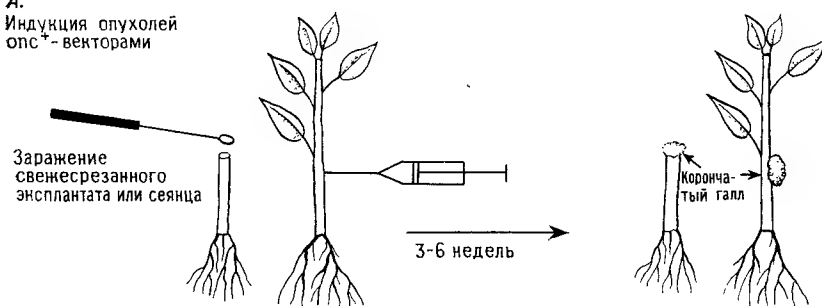
²⁾ На этом этапе клетки можно разделить на аликвоты по 200 мкл и длительное время хранить при –70 °C. Чтобы использовать их в работе, достаточно добавить ДНК и продолжить экспериментальную процедуру со стадии 6.

цию созданных *in vitro* генетических конструкций в геном двудольных растений, где эти конструкции в принципе могут успешно экспрессироваться. Были разработаны различные векторные системы на базе Ti-плазмид (разд. 2). В некоторых таких системах (*onc*⁺) используются естественные онкогенные свойства Ti-плазмидной Т-ДНК, которая индуцирует у растения развитие опухоли. В других векторах (*onc*[–]) ген *onc* удален из Т-ДНК, и вместо него введен доминантный селективный маркер, который позволяет отбирать рекомбинантные, но не претерпевшие опухоловой трансформации клетки. Основным недостатком Ti-плазмидных систем заключается в том, что вирулентные штаммы *A. tumefaciens*, по всей видимости, не способны трансформировать однодольные растения. В данном разделе мы намерены описать основные методические приемы, которые позволяют успешно трансформировать растительные клетки *onc*⁺- и *onc*[–]-векторами с использованием вирулентных агробактерий для введения ДНК в растительные клетки. Далее мы вкратце коснемся некоторых систем, которые предполагают введение свободных ДНК-векторов в растительные протопласты. И в заключение мы рассмотрим комбинации векторных систем и различных систем «доставки» ДНК в растительные клетки в отношении их влияния на регенерацию трансформированных растений и стабильность введенных генов в мейозе.

3.1. Индукция опухолей у стерильных семян и эксплантов вирулентными и онкогенными агробактериями

Для большинства видов растений наиболее подходящий материал для опухолевой индукции — стерильные семена или ткань, культивируемая *in vitro*. Использование стерильного растительного материала является весьма важным моментом и позволяет избежать загрязнения трансформированной растительной ткани микроорганизмами, отличными от агробактерий. В противном случае зараженная среда культивирования может оказаться губительной для растительных клеток. Кроме того, присутствие посторонней микрофлоры может исказить результаты молекулярно-биологических и биохимических исследований, проводимых на трансформированном материале. Если семена или размножаемый материал недоступны, в некоторых случаях допускается инокулировать растения *in vivo*. Альтернативная воз-

А. Индукция опухолей *onc*⁺-векторами



Б. Трансформация *onc*⁺-векторами

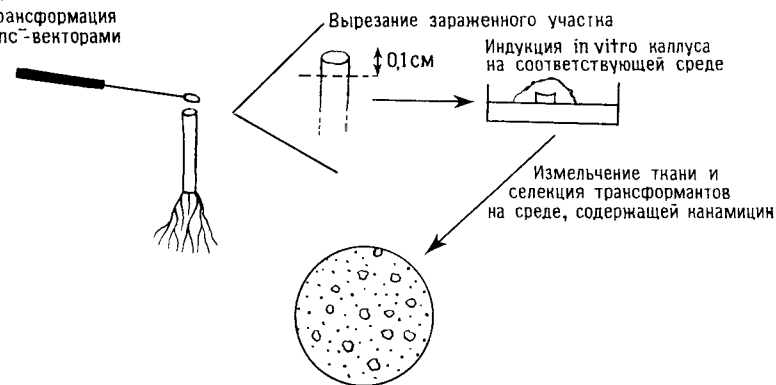


Рис. 6. Схема, иллюстрирующая методы введения в растительные ткани *onc*⁺- и *onc*⁻-векторов на основе Ti-плазмид.

Таблица 9. Среда для культивирования растений

А. Солевой состав среды (MS) [39]

1. MSO

Компонент	Количество в 1 л
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,44 г
NH ₄ NO ₃	1,65 г
KNO ₃	1,90 г
KI	0,83 мг
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025 мг
KH ₂ PO ₄	0,17 г
H ₃ BO ₃	6,2 мг
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25 мг
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,37 г
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22 мг
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025 мг
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6 мг
FeNaЭДТА	36,7 мг
Глицин	2 мг
Инозитол	0,1 г
Никотиновая кислота	0,5 мг
Пиридоксин-HCl	0,5 мг
Тиамин-HCl	0,1 мг
Сахароза	30 г

Доведите pH до 5,6 0,1 M HCl. Все вышеперечисленные компоненты, за исключением сахарозы, поставляются фирмой Flow Labs расфасованными и взвешенными.

2. MSO IC

Добавьте карбенициллин к расплавленной среде MSO (при 45 °C) до концентрации 1 мг/мл. Для этого удобно использовать стерилизованный фильтрованием концентрированный раствор карбенициллина (100 мг/мл).

3. MSP1

В состав этой среды помимо всех компонентов среды MSO входит: NAA (нафалинуксусная кислота) 2,0 мг/л; 6BAP (6-бензиламинопури) 0,5 мг/л. Растворите 500 мг NAA в 20 мл 50%-ного этанола; добавьте 80 мкл к 1 л MSO. Растворите 126 мг 6BAP в 1 мл 1 M HCl и прилейте 99 мл дистиллированной воды; добавьте 400 мкл к 1 л MSO.

4. MSP1 9 M, 7 M, 3 M

Добавьте необходимое количество маннитола (9, 7 или 3% по весу) к MSP1, перед тем как довести ее объем до конечной величины. Для MSP1 9, 7 и 3 M это составит соответственно 90, 70 и 30 г/л. Если необходимо, в среду добавляют агар до 0,8% (8 г/л). Обычно агар растворяют, нагревая среду перед тем, как ее автоклавировать.

Продолжение

Б. Среда Caboche [40]

	Компонент	Количество в 100 мл 100X-рас- твора	Конечная концентра- ция (мг/л)
100X растворы			
Раствор 1	NH ₄ NO ₃	4 г	400,0
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	2,93 г	293,0
Раствор 2	MgSO ₄ ·7H ₂ O	2,46 г	246,0
Раствор 3	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0,27 г	27,0
	Na ₂ ЭДТА	0,37 г	37,0
Раствор 4	KH ₂ PO ₄	0,68	68,0
Раствор 5	H ₃ BO ₃	62 мг	6,2
	MnSO ₄ ·H ₂ O	1,7 мг	0,17
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,8 мг	0,28
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,25 мг	0,025
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25 мг	0,025
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,24 мг	0,024

Компоненты, добавляемые непосредственно в готовую среду

Пиридоксин	180,0
NAA	0,1
6BAP	1,0
Сахароза	20 000,0
pH 5,6	

Перед использованием в эту среду необходимо внести глутамин до 2 мМ. Глутамин растворяют в дистиллированной воде до концентрации 23,36 мг/мл, стерилизуют фильтрованием и хранят при -20 °С. Добавляют 1,2 мл раствора в жидкую или расплавленную агаризованную среду (при 45 °С). Концентрированный раствор пиридоксина готовят, растворяя его в дистиллированной воде до концентрации 5 мг/мл. Агаризованные среды содержат 8 г/л агара.

возможность заключается в отборе эксплантатов из тепличного материала с последующей опухолевой индукцией *in vitro*, при этом строго контролируется стерильность препарата. Для обеспечения стерильности все работы с растительным материалом следует проводить в ламинарном боксе, используя только автоклавированные инструменты и среды. Рецепты сред для культивирования растительных тканей приведены в табл. 9; применяемые антибиотики описаны в табл. 10. Приготовление эксплантатов и их инфицирование *A. tumefaciens* описаны в табл. 11 и 12. Схематически процедура инфицирования представлена на рис. 6.

3.2. Трансформация эксплантатов с помощью опс⁻-векторов, содержащих доминантные селективные маркеры

На сегодняшний день наиболее широко используемым доминантным селективным маркером трансформации является устойчивость к аминогликозидному антибиотику канамицину, обу-

Таблица 10. Антибиотики, используемые при культивировании растительных тканей

Карбенициллин (Sigma)	Растворите в дистиллированной воде (100 мг/мл) и стерилизуйте фильтрованием. Раствор можно хранить при 4 °С в течение 1 месяца или заморозить при -20 °С
Цефотаксим (Hoechst)	Растворите в дистиллированной воде (50 мг/мл) и стерилизуйте фильтрованием. Храните при -20 °С. Цефотаксим в культуральной среде разлагается на свету приблизительно за три недели
Канамицин (Sigma)	Растворите в дистиллированной воде (10 мг/мл) и стерилизуйте фильтрованием. Храните при 4 °С в течение месяца или заморозьте при -20 °С
Рифампицин (Sigma)	Растворите в метаноле (20 мг/мл). Для этого взвесьте нужное количество рифампицина в стерильном флаконе, добавьте метанол, закройте флакон и встряхните, чтобы антибиотик растворился. Храните при -20 °С в течение трех месяцев
Тетрациклин (Sigma)	Растворите в дистиллированной воде (10 мг/мл) и стерилизуйте фильтрованием. Храните при 4 °С в течение месяца или заморозьте при -20 °С

Таблица 11. Приготовление растений для инокуляции

А. Из стерильных семян

1. Проведите поверхностную стерилизацию семян в 10%-ном (по объему) растворе гипохлорита натрия (конечная концентрация активного хлора должна составлять около 1%). Продолжительность стерилизации зависит от вида семян, однако в среднем достаточно 10—30 мин. Если семена имеют восковую кутикулу, ворсистую поверхность или поверхность с развитым рельефом перед стерилизацией, их можно в течение 5—10 с промыть в 10%-ном этаноле.

2. Промойте семена в пяти сменах стерильной водопроводной воды. Если семена мелкие, удобно поместить их в нейлоновую марлю или нейлоновое или стальное сито (например, чайное ситечко).

3. Прорастите семена на агаризованной (0,8%) среде MSO¹⁾. Инкубируйте культуральные сосуды²⁾ при 25 °С в условиях умеренного освещения (1000 люкс).

Б. Из эксплантатов

1. Отрежьте молодые побеги от выращенных в тепличных условиях растений и простерилизуйте их поверхностно в 10%-ном (по объему) растворе гипохлорита натрия в течение 20—30 мин.

2. Промойте побеги в пяти сменах стерильной водопроводной воды.

3. Используя в качестве подставки стерильную стеклянную пластину, белую глазурованную кафельную плитку или большую чашку Петри, с помощью стерильного скальпеля удалите с побегов все ткани, разрушенные хлорной известью. Срежьте крупные нижние листья и нарежьте побеги на кусочки длиной 4 см (или такого максимального размера, чтобы они по высоте помещались в культуральный сосуд).

4. Вставьте эксплантаты базальным концом в агаризованную среду MSO.

¹⁾ Все среды, используемые при культивировании растений, описаны в табл. 9.

²⁾ Удобные культуральные сосуды — флаконы «Universal» или «Powder Round Jars» фирмы Beatson Clark and Co. Ltd. В один флакон «Universal» заливаете 6 мл среды, а во флакон «Powder Round Jars» — 40 мл среды.

Таблица 12. Инфицирование *A. tumefaciens*

1. Срежьте стерильным скальпелем верхушки растений, культивируемых *in vitro*, или стерильных сеянцев или используйте свежие стеблевые эксплантаты.

2. Нанесите на поверхность среза петлей ночную культуру онкогенного штамма *A. tumefaciens* (см. рис. 6, А). Другой вариант — уколите стебель растения иглой для подкожных инъекций, предварительно смоченной ночной культурой *A. tumefaciens*.

3. Инкубируйте инфицированные растения в течение 3—6 нед при 25 °C в условиях умеренного освещения (600—1000 люкс).

4. Отделите опухоли, когда они достигнут 3—10 мм в диаметре, и поместите на среду MSO IC¹⁾ (5 мл среды в пластиковой чашке Петри диаметром 5 см). Среда MSO IC содержит антибиотик карбенициллин в концентрации 1 мг/мл, который вызывает гибель агробактерий, не имеющих активного гена β-лактамазы (*Apr^r*). Альтернативные варианты применения антибиотиков для уничтожения бактерий в опухолях включают²⁾ рифампицин (50 мкг/мл) в сочетании с тетрациклином (10 мкг/мл), цефотаксим (500 мкг/мл), ванкомицин (100 мкг/мл).

5. Перенесите ткань через 3—6 нед (в зависимости от ростового статуса изолированной опухоли) на среду MSO, содержащую 0,5 мг/мл карбенициллина, и далее продолжайте культивирование на среде MSO, содержащей 0,25 мг/мл карбенициллина. Если карбенициллин не подходит, используйте среды с последовательно снижаемым содержанием других антибиотиков.

6. Периодически проверяйте стерильность опухоли путем инкубирования маленьких кусочков в питательной среде в течение двух дней при 25 °C в условиях интенсивной аэрации. Когда в опухоли не останется жизнеспособных бактерий, можно перенести ее на среду MSO без антибиотика.

¹⁾ Рецепт сред приведена в табл. 9.

²⁾ Приготовление растворов антибиотиков описано в табл. 10.

словленная активностью фермента неомицинфосфотрансферазы (NPT II). Структурный ген NPT II, находящийся под контролем *nos*-промотора (см. разд. 2), способен обеспечить устойчивость клеток, побегов и сеянцев к канамицину при его концентрации в среде 500 мкг/мл и даже выше [9]. Методика такой доминантной селекции приведена в табл. 13. Методические приемы для осуществления прямой регенерации трансформированных побегов, экспрессирующих доминантные маркеры, описаны в разд. 3.5.

Таблица 13. Доминантная селекция трансформированного каллуса

1. Приготовьте стеблевые эксплантаты или усеченные сеянцы и проведите их заражение, как описано в табл. 12.

2. Инкубируйте в течение 2—3 нед при 25 °C и интенсивности освещения 600—1000 люкс. Отделите зараженную верхушку стебля, срезав ее на расстоянии 1—2 мм от поверхности исходного среза (см. рис. 6, Б).

3. Поместите зараженный эксплантат на подходящую среду для индукции каллуса; среда должна содержать антибиотик для уничтожения агробактерий (см. табл. 12). Состав среды зависит от вида растения. Для табака, например, используется среда MSP1.

4. После индукции каллуса отделите кусочки ткани (если необходимо, воспользуйтесь скальпелем) и поместите эти кусочки на селективную среду, например MSP1, содержащую канамицин в концентрации 100 мкг/мл.

3.3. Трансформация растительных клеток при совместном культивировании с *A. tumefaciens*

Вызывая образование корончатых галлов, *Agrobacterium* трансформирует клетки, окружающие поврежденный участок ткани, именно те клетки, которые приступили к делению в ответ на повреждение (раневой ответ). Клетки интактного растения обнаруживают максимальную чувствительность к трансформирующему действию *A. tumefaciens* в интервале между 1,5 и 2 днями после повреждения. У некоторых видов эта компетентная фаза коррелирует с пиком клеточных делений, сопровождающих раневой ответ. Показано [24], что раневой ответ можно имитировать в культуре. Для этого необходимо протопластировать покоящиеся клетки мезофилла листа или активно делящиеся культивируемые клетки и затем дать возможность протопластам регенерировать клеточную стенку и приступить к делению на подходящей среде. На определенной стадии совместного культивирования с *A. tumefaciens* можно получить клональные колонии трансформантов. Необходимо ясно представлять, что корончатые галлы являют собой смесь нетрансформированных и нескольких типов независимо трансформированных клеток, поэтому фенотип опухоли по сути представляет сумму фенотипов всех входящих в нее типов клеток. В то же время трансформанты, полученные в результате совместного культивирования, в норме содержат только один тип трансформированных клеток; это исключает фенотипическое маскирование и значительно уменьшает вероятность ошибочных результатов при скрещивании и последующем анализе. Колонии трансформантов можно отбирать по способности к гормоннезависимому росту — в случае *onc⁺*-векторов или путем селекции на средах, содержащих антибиотики, — в случае *onc⁻*-векторов, несущих доминантные селективные маркеры (такие, например, как устойчивость к канамицину).

3.3.1. Получение протопластов из клеток высших растений

Методы получения протопластов различаются для разных видов растений и, кроме того, зависят от типа исходного растительного материала (например, мезофилл листа или суспензия культивируемых клеток). Процедуры приготовления и культивирования протопластов для многих растений можно найти в литературе [25, 26]. Следует лишь заметить, что для совместного культивирования с *Agrobacterium* пригодны только весьма жизнеспособные протопласты. В качестве модели мы выбрали клетки листового мезофилла *N. tabacum* var. Xanthi и в данной главе рассмотрим процедуры приготовления, культивирования и трансформации протопластов на примере этого объекта. Фо-

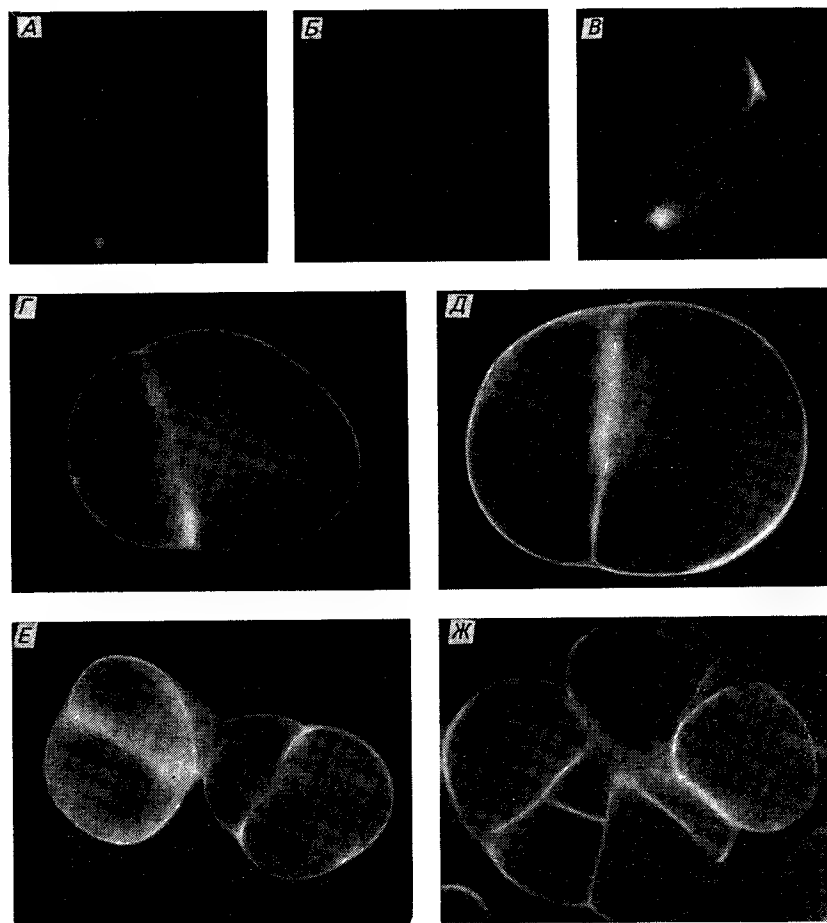


Рис. 7. Последовательные этапы синтеза клеточной стенки и ранних клеточных делений протопластов листового мезофилла *N. tabacum* cv. Xanthi (УФ-визуализация после окрашивания тинопалом). А. Свежевыделенные протопласты ($\times 400$). Б. После одного дня культивирования протопласты обнаруживают незначительную флуоресценцию, обусловленную малым количеством материала регенерирующей клеточной стенки ($\times 325$). В. Протопласты после 5 дней культивирования: видна формирующаяся клеточная пластинка ($\times 583$). Г. После семи дней культивирования протопласты претерпевают первое клеточное деление ($\times 1142$). Д. Увеличение размеров клетки после первого деления — девять дней культивирования ($\times 909$). Е. Протопласты после десяти дней культивирования: формирование клеточной пластинки перед вторым делением ($\times 440$). Ж. Небольшая колония после 14 дней культивирования ($\times 600$).

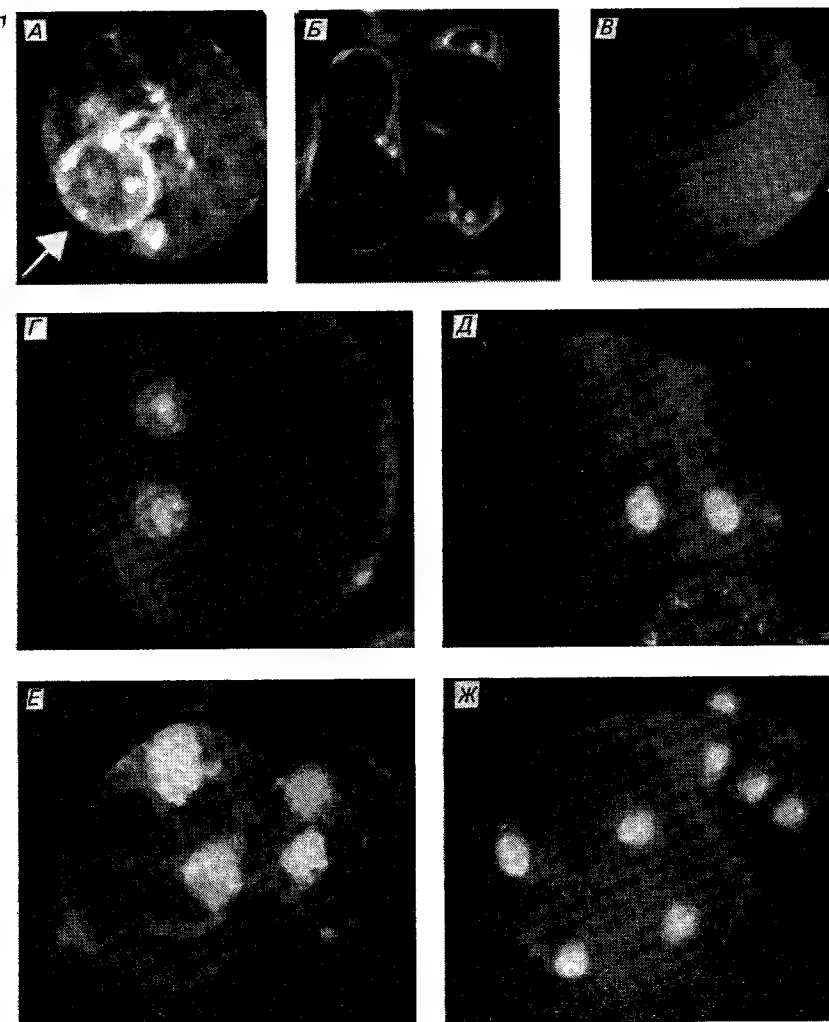


Рис. 8. Последовательные этапы митотического деления протопластов листового мезофилла *N. tabacum* cv. Xanthi на ранних стадиях культивирования (УФ-визуализация после окрашивания акридиновым оранжевым). А. Свежевыделенный протопласт с одним хорошо заметным ядром (показано стрелкой) ($\times 600$). Б. После трех дней культивирования протопласты имеют уже сформировавшуюся клеточную стенку, однако в каждой клетке пока заметно только одно ядро ($\times 370$). В. Жизнеспособный протопласт после четырех дней культивирования: ядро неразличимо ($\times 633$). Г. Протопласты после первого митотического деления — приблизительно шесть дней культивирования ($\times 1222$). Д. Через восемь дней культивирования в протопластах, претерпевших первое митотическое деление, хорошо видны два ядра ($\times 1000$). Е. После второго митотического деления (приблизительно десять дней культивирования) видны четыре ядра ($\times 1333$). Ж. Результат третьего митоза — небольшая колония после 12 дней культивирования ($\times 1028$).

Таблица 14. Получение протопластов из клеток табака

1. Срежьте практически полностью распутившиеся листья двухмесячного растения табака.

2. Простерилизуйте листья, погрузив их на 20 мин в 10%-ный (по объему) раствор гипохлорита натрия, и затем промойте их 5 раз в стерильной водопроводной воде.

3. Дайте листьям слегка подвзнуть в стерильном ламинарном боксе и затем удалите при помощи тонкого пинцета нижний эпидермис.

4. Кусочки обработанного таким образом листа поместите в чашку Петри диаметром 14 см с 30 мл среды CPW 13M¹⁾ так, чтобы оголенный мезофилл контактировал со средой; на этой стадии происходит плазмолиз клеток.

5. Когда вся поверхность жидкости окажется покрытой кусочками листьев, замените среду CPW 13M 20 мл ферментной смеси²⁾. Инкубируйте чашку в темноте при 25 °C в течение ночи (16—18 ч).

6. Освободите протопласты, мягко покачивая чашку с кусочками гидролизованных листьев. Наклоните чашку и стерильным пинцетом удалите из суспензии протопластов крупные остатки листьев. Пропустите суспензию через стерильный фильтр с размером пор 64—100 мк.

7. Перенесите суспензию в центрифужную пробирку с винтовой крышкой (16·20 мм, Corning) и центрифугируйте при 100 g в течение 5 мин.

8. Осадок протопластов аккуратно ресуспендируйте при помощи пастеровской пипетки в среде CPW 13M и снова открутите при 100 g в течение 5 мин. На этой стадии целесообразно отделить интактные протопласты от разрушенных протопластов и клеток. Для этого ресуспендируйте осадок протопластов в среде CPW 21S¹⁾ и центрифугируйте суспензию в течение 10 мин при 150 g. В процессе центрифугирования интактные протопласты сформируют тонкий слой материала на поверхности среды 21S¹⁾, а более плотные разрушенные протопласты и клеточные обломки осадут на дно пробирки. Протопласты отбирают пастеровской пипеткой и перед тем, как продолжать работу, разводят средой MSP1 9M. Следует, однако, заметить, что многие типы протопластов чувствительны к инкубации в растворах с высоким содержанием сахарозы, а некоторые их типы оказываются просто слишком плотными, чтобы флотировать. Таким образом, в ряде случаев описанная дополнительная очистка протопластов невозможна.

9. Промойте протопласты дважды, ресуспендируя их в среде MSP1 9M и осаждавая на центрифуге.

10. После последнего центрифугирования осадок ресуспендируйте в 10 мл (или в другом известном объеме) среды MSP1 9M и при помощи гемоци-тометра подсчитайте число живых протопластов. Живые протопласты имеют правильную сферическую форму и интактные хлоропласты (овальной формы), которые случайным образом распределены в цитоплазме. Нежизнеспособные протопласты часто бывают неправильной формы, с деформированными хлоропластами, которые группируются у одного края клетки.

11. Высейте протопласты при плотности суспензии приблизительно $2 \cdot 10^5$ живых клеток на 1 мл в 5 мл жидкой среды MSP1 9M на чашку диаметром 9 см, предварительно залитую 12 мл агаризованной среды MSP1 9M (0,8%-ного агара). Таким образом, конечная плотность высеваемой суспензии составляет $5 \cdot 10^4$ протопластов на 1 мл.

12. Инкубируйте чашку в условиях слабой освещенности (600 люкс) при 25 °C.

¹⁾ См. табл. 15.

²⁾ Ферментная смесь содержит 0,2% целлюлозы и 0,05% пектиназы в среде CPW 13M (см. табл. 15).

Таблица 15. Растворы для получения растительных протопластов

А. Солевая смесь	Компонент	Содержание в 10 л 100X-раствора	Концентрация (мг/л)
CPW раствор 1	KH ₂ PO ₄	2,72 г	27,2
	KNO ₃	10,1 г	101,0
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	24,6 г	246,0
	KI	16 мг	0,16
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2,5 мг	0,025
CPW раствор 2	CaCl ₂ ·2H ₂ O	148 г	1480,0

CPW 13M представляет собой 13%-ный (по весу) раствор маннитола в солевой смеси CPW; CPW 9M — 9%-ный раствор маннитола; CPW 21S — 21%-ный раствор сахарозы. pH среды доводят до 5,8 и стерилизуют автоклавированием.

Б. Ферментный раствор для получения протопластов из клеток мезофилла листьев табака

Целлюлоза «Онозука» R-10 0,2% (по весу)
Мацерозим R-10 0,5% (по весу)

Эти ферменты производит японская фирма Yakult Pharm. Industry Co. Ltd. Растворите оба ферментных препарата в среде CPW 13M, простерилизуйте фильтрованием через мембрану 0,45 мкм и храните при —20 °C.

Таблица 16. Флуоресцентное окрашивание препаратов для контроля за развитием протопластов

А. Визуализация регенерированной клеточной стенки с помощью тинопала

1. Приготовьте насыщенный раствор тинопала (Ciba Geigy UK Ltd.) в дистиллированной воде и храните его в темноте при 4 °C.

2. Не взбалтывая насыщенный раствор, чтобы не поднять со дна нерастворившиеся частицы красителя, добавьте 0,1 мл его к 20 мл среды CPW 9M и перемешайте. Эту смесь можно стерилизовать фильтрованием и хранить в холодильнике в течение двух месяцев.

3. Смешайте одну каплю рабочего раствора тинопала (см. п. 2) с каплей суспензии протопластов на чистом предметном стекле и накройте покровным стеклом.

4. Оставьте на 5 мин при комнатной температуре.

5. Проанализируйте препарат под микроскопом, снабженным эпифлуоресцентной приставкой (например, Nikon Optiphot, XF-EF¹⁾) с УФ-фильтром возбуждения, имеющим полосу пропускания 330—380 нм (Nicon excitation filter cassette U; 365 nm в сочетании с дополнительным УФ-фильтром возбуждения 330—380), и с барьерным фильтром, выделяющим составляющую флуоресценции в области 420 нм (Nicon eyepiece-side absorption filter 420 K). Пример окрашенного тинопалом препарата протопластов приведен на рис. 7.

Б. Визуализация ядер с помощью акридинового оранжевого

1. Растворите 10 мг акридинового оранжевого (Sigma) в 4 мл 50 mM глицин-NaOH-буфера pH 8,5 и смешайте с 6 мл среды CPW 13M. Храните при 4 °C в темноте.

Продолжение

2. Добавьте каплю раствора красителя к 3 мл суспензии протопластов и инкубируйте в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин.

3. Промойте протопласты дважды, центрифугируя препарат при 100 g в течение 5 мин и ресуспендируя его в среде CPW 9 M.

4. Проанализируйте препарат в УФ-микроскопе, используя синий фильтр возбуждения¹⁾ (Nicon excitation filter cassette code B, 495 в сочетании с дополнительным фильтром возбуждения 460) и барьерный фильтр, выделяющий составляющую флуоресценции в области 515 нм (Nicon euerpiece-side absorbtion filter 515 W). Пример окрашенного акридиновым оранжевым препарата протопластов приведен на рис. 8.

¹⁾ Указанное оборудование фирмы Nicon использовалось авторами; допустимы любые эквивалентные замены.

тографии, приведенные на рис. 7, представляют различные стадии биосинтеза клеточной стенки и раннего клеточного деления; рис. 8 демонстрирует различные стадии митотической активности в протопластах *N. tabacum* cv. Xanthi. Процедура приготовления протопластов описана в табл. 14. Растворы, необходимые для этой процедуры, приведены в табл. 15, а методики окрашивания и визуализации протопластов даны в табл. 16.

3.3.2. Совместное культивирование протопластов и *Agrobacterium* и селекция колоний трансформантов

Культуру протопластов следует регулярно контролировать, используя инверсионный микроскоп. Отметьте, когда произойдут первые клеточные деления. Микроскопический анализ можно упростить, окрашивая небольшие образцы препарата флуоресцентными красителями типа Тинопал (Tinopal), которые связываются с целлюлозосодержащими материалами и позволяют визуализировать новообразованные клеточные стенки и клеточные пластинки при ультрафиолетовой микроскопии (см. табл. 16, А). Развитие протопластов можно также контролировать, наблюдая за делением ядер, окрашенных акридиновым оранжевым, в УФ-микроскопе (табл. 16, Б). Когда 20—30% клеточной популяции вступит в первое деление, протопласты готовы для совместного культивирования с *Agrobacterium*; соответствующие экспериментальные процедуры описаны в табл. 17.

Селекцию колоний трансформированных растительных клеток можно проводить либо на среде, не содержащей фитогормона, — в случае *opc*⁺-векторов, либо на среде с высоким содержанием антибиотика, который в норме токсичен для клеток, — в случае *opc*⁻-векторов, несущих доминантные селективные маркеры (например, ген устойчивости к канамицину) (рис. 9). Здесь следует остановиться на некоторых принципиальных моментах, касающихся условий селекции. Во-первых, микроколони должны обладать достаточным размером, чтобы их можно

Таблица 17. Совместное культивирование протопластов с *Agrobacterium*

1. Когда 20—30% клеточной популяции вступит в первое деление (рис. 7, Г), промойте протопласты жидкой средой MSP1 7 M и пересейте на эту же агаризованную среду. Обычно к этой процедуре приступают через 3—10 дней после получения протопластов в зависимости от конкретного препарата. На данной стадии большая часть клеточной популяции заканчивает первое деление ядра и находится в фазе G1 второго деления, готовясь начать репликацию ДНК (рис. 8, Г). Нормальный процесс развития протопластов *N. tabacum* показан на рис. 7 и 8.

2. При помощи пастеровской пипетки добавьте три капли ночной культуры *Agrobacterium* к препарату протопластов. При этом на каждую растительную клетку приходится около 100 бактерий.

3. Инкубируйте в условиях слабой освещенности (600 люкс) при 25°C в течение 40 ч. За это время растительные клетки и бактерии склеятся вместе, образовав единый слой, в котором растительные клетки связаны друг с другом бактериальными агрегатами.

4. Разъедините агрегированные растительные клетки путем мягкого пипетирования пастеровской пипеткой и затем осадите их центрифугированием при 100 g в течение 5 мин. Ресуспендируйте осадок клеток в среде MSP1 7 M, содержащей 1 мг/мл карбенициллина или другой подходящий антибиотик, и еще раз отцентрифугируйте.

5. Ресуспендируйте клетки для высева в 6 мл жидкой среды MSP 7 M, содержащей подходящий антибиотик (например, карбенициллин в концентрации 1 мг/мл), и высейте клетки на 12 мл этой же агаризованной среды (0,8%-ный агар). Для того чтобы ингибировать рост агробактерий, можно использовать те же концентрации антибиотиков, которые применяются для очистки корончатых галлов (раздел 3.1.2).

6. После 7—10-дневного периода роста перенесите растительные клетки на среду MSP1 3 M с антибиотиком и инкубируйте еще в течение недели.

было высевать при низкой плотности. Высев при высокой плотности приводит к тому, что колонии врастают друг в друга; это осложняет отбор клонов и, кроме того, вызывает проблемы, связанные с перекрестным обменом метаболитами. Во-вторых, условия селекции должны быть таковы, чтобы массовый некроз нетрансформированного материала не ингибировал прорастание трансформированных колоний. Следовательно, первичную селекцию желательно проводить на среде, содержащей пограничные ингибирующие концентрации антибиотика, в особенности если протопласты демонстрируют невысокую жизнеспособность. Предполагаемых трансформантов можно затем отобрать и перенести на среду, которая содержит желаемые количества селективного агента. В-третьих, надо иметь в виду, что наследственная устойчивость растительной колонии к токсическому действию антибиотика часто повышается с увеличением ее размера (возраста!). Методика селекции *opc*⁺-трансформантов на среде, не содержащей фитогормонов (MSO), приведена в табл. 18. Методика селекции *opc*⁻-трансформантов, экспрессирующих устойчивость к канамицину, приведена в табл. 19; в качестве примера взят вектор, экспрессия которого в колониях клеток табака обеспечивает их устойчивость к канамицину при его concentra-

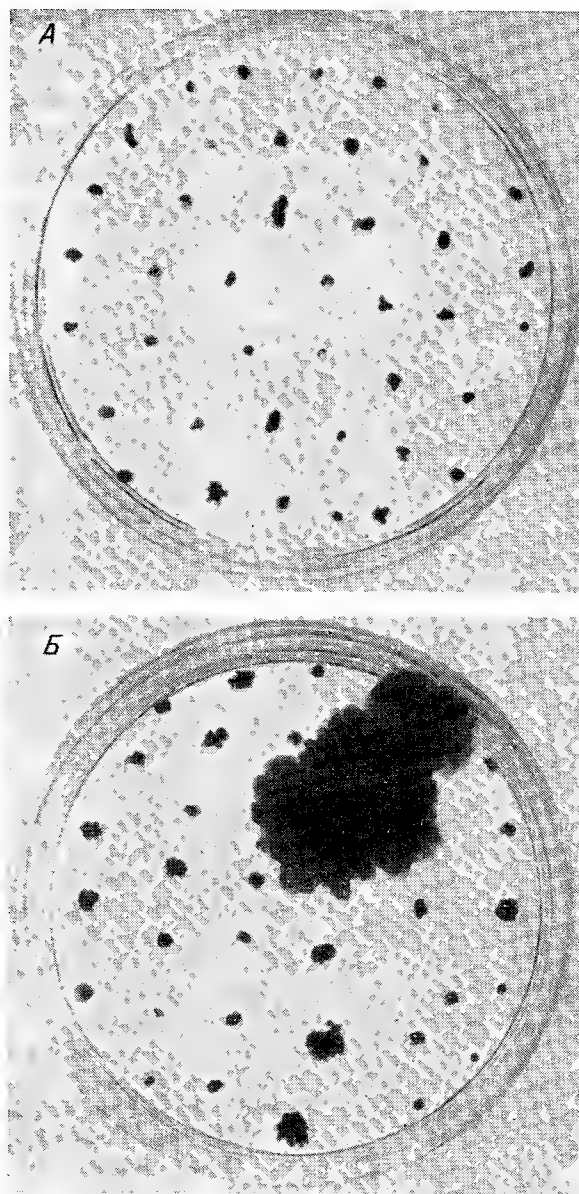


Рис. 9. Рост колоний после четырехнедельного культивирования на среде без гормона. Пятьдесят колоний приблизительно 1,5—2,0 мм в диаметре высели в 9 см пластиковую чашку Петри на 30 мл среды MSO, содержащей 1 мг/мл карбенициллина. А. Колонии, образованные неинфицированными протопластами *P. parodii*. Б. Колонии, образованные протопластами *P. parodii*, которые были инфицированы (через семь дней после получения) *A. tumefaciens* pTiAch5 (10^7 /мл, инкубация в течение 36 ч).

Таблица 18. Селекция *onc*⁺-трансформантов на среде, не содержащей фитогормонов.

1. Перенесите 16—30-дневные колонии (в зависимости от интенсивности роста протопластов, см. п. 6, табл. 17) в центрифужные пробирки и промойте их 12 мл среды MSO¹⁾, содержащей 0,5 мг/мл карбенициллина. Подсчитайте число колоний в 1 мл.
2. Внесите колонии при плотности 500 колоний на 1 мл в 8 мл расплавленного и охлажденного до 40°C MSO-агара, содержащего 0,5 мг/мл карбенициллина, и наложите его на чашку Петри диаметром 9 см, залитую 10—15 мл этой же среды. Для менее жизнеспособных систем (по сравнению с протопластами табака) при приготовлении твердой среды MSO вместо агара лучше использовать легкоплавкую агарозу.
3. Выберите колонии, которые растут на среде MSO без гормонов в присутствии 0,25 мг/мл карбенициллина или соответствующих количеств других антибиотиков. Перенесите 50 колоний размером 2—5 мм в чашку Петри диаметром 9 см с 25 мл среды (см. рис. 9).

¹⁾ Рецепт среды приведена в табл. 9.

Таблица 19. Селекция *onc*⁺-трансформантов, экспрессирующих устойчивость к канамицину

1. Перенесите колонии (см. п. 6 табл. 17) в центрифужные пробирки и промойте 12 мл среды Sabosche, содержащей 100 мкг/мл канамицина, а также 0,5 мг/мл карбенициллина (или другого подходящего антибиотика) для того, чтобы ингибировать рост агробактерий.
2. Подсчитайте число колоний в 1 мл и внесите суспензию при плотности 500 колоний на 1 мл в 8 мл агаризованной среды Sabosche, содержащей соответствующий антибиотик и 100 мкг/мл канамицина; наложите агар на чашку Петри диаметром 9 см, залитую 100 мл этой же среды.
3. Выберите канамициноустойчивые колонии и перенесите их на среду MSP1, последовательно снижая содержание антибиотиков, убивающих агробактерии и поддерживая оптимальный уровень канамицина (200—1000 мкг/мл) для селекции устойчивых к канамицину колоний трансформированных растительных клеток.

¹⁾ См. табл. 9.

ции в среде 100 мкг/мл (разд. 2). Рост нормальных клеток заметно угнетается при концентрациях канамицина в среде, превышающих 50 мкг/мл.

3.4. Введение ДНК в растительные клетки с помощью изолированных ДНК-векторов

Трансформация интактных растений или растительных клеток путем их взаимодействия с *onc*⁺- или *onc*⁻-бактериями *A. tumefaciens* весьма эффективна, но не лишена ряда недостатков. Одна из главных проблем трансформировать с помощью *Agrobacterium*. Многие хозяйственные культуры, в первую очередь бобовые, демонстрируют слабую реакцию на заражение *Agrobacte-*

rium, а протопласты этих видов часто оказываются недостаточно выносливыми, чтобы выдержать процедуру культивирования. Кроме того, экстракты трансформированных тканей, используемые для изучения транскрипции и трансляции трансформированных генов, могут быть загрязнены агробактериями, что ведет к различного рода ошибкам. И наконец, существующие методики генно-инженерных экспериментов с Ti-плазмидами достаточно сложны и трудоемки и требуют больших затрат времени. Перечисленные неудобства стимулировали поиск и разработку систем переноса ДНК в клетки высших растений, которые бы не были связаны с использованием вирулентного *A. tumefaciens*.

Было разработано несколько методов введения биологически активных нуклеиновых кислот в эукариотические клетки; многие из них были опробованы на растительных протопластах с весьма скромным успехом. Перечислим основные методические разработки в этой области.

1. Химически стимулируемый захват изолированной ДНК или ДНК-преципитата с использованием таких активаторов процессов эндоцитоза и слияния клеток, как полиэтиленгликоль (PEG).

2. Слияние или эндоцитоз содержащих плазмиды липосом с растительными протопластами.

3. Слияние или эндоцитоз содержащих плазмиды бактериальных сферопластов с растительными протопластами.

4. Прямое введение плазмидных векторов в растительные протопласты и их ядра путем микроинъекций.

Все эти методики нашли свое отражение в обзоре [26]. На сегодняшний день наиболее удачной из них следует признать процедуру введения Ti-плазмидной ДНК в растительные протопласты с применением PEG [27, 28], хотя выход трансформированных клеток здесь чрезвычайно низок ($\sim 10^{-5}$). Не вызывает, однако, сомнения, что все описанные методики действительно обеспечивают введение ДНК в интактной форме по крайней мере в цитоплазму протопластов и что отсутствие трансформации связано с конструкцией вектора или компетентностью протопластов. Методика стимулируемого полиэтиленгликолем введения плазмидной ДНК в протопласты описана в табл. 20. Эта же процедура может использоваться для слияния протопластов с липосомами или сферопластами *E. coli*. В случае использования сферопластов целесообразно попробовать увеличить концентрацию PEG до 25% (по весу).

3.5. Регенерация трансформированных растений

Исследования, проведенные в последние несколько лет, показали, что регенерировать растение из тканей, трансформированных онкогенными штаммами *A. tumefaciens*, невозможно.

Таблица 20. Трансформация растительных протопластов изолированными плазмидными векторами с использованием полиэтиленгликоля

1. Приготовьте протопласты, как описано в табл. 14. Осадите $1-3 \cdot 10^6$ протопластов в среде MSP1 9M в центрифужной пробирке размером 16×125 мм.
2. Добавьте плазмидную ДНК (в стерильной дистиллированной воде) в минимально возможном объеме (например, 25 мкг в 20 мкл) и аккуратно перемешивайте в течение 10 с пастеровской пипеткой.
3. Добавьте 2 мл стерильного 15%-ного (по весу) раствора PEG 6000 (Koch-Light Ltd.) в среде MSP1 9M и перемешайте, покатывая пробирку между ладонями.
4. Инкубируйте при 27°C в течение 30 мин и затем медленно добавьте 10 мл MSP1 9M.
5. Осадите протопласты центрифугированием при 100 g в течение 10 мин и затем ресуспендируйте их в 1 мл MSP1 9M. Оставьте на 30 мин при комнатной температуре.
6. При необходимости можно отделить интактные протопласты от разрушенных, используя центрифугирование в среде CPW 21S, соответствующая процедура описана в табл. 14.
7. Промойте осадок протопластов, ресуспендируя его в MSP1 9M. Подсчитайте их число и затем высейте, как описано в табл. 14.
8. Проведите селекцию трансформантов, высевая микроколонию на соответствующую селективную среду, как описано в табл. 19.

Однако в отдельных случаях все-таки формируются трансформированные побеги, которые очень редко дают корни. Это наблюдается для корончатых галлов (в особенности для тех опухолей, которые были индуцированы *shooty*-мутантами агробактерий) и для тканей, трансформированных путем совместного культивирования с *onc*⁺-штаммами. В тех случаях, когда удалось получить интактные трансформированные растения [29], было показано, что трансформационные маркеры стабильно проходят через мейоз, только если Т-ДНК претерпела делеции и перестройки, нарушившие функционирование онкогенных локусов (*tms1*, *tms2*, *tmr*). Естественно, максимум усилий был сразу же направлен на то, чтобы получить *onc*⁻-векторы (см. разд. 2), которые, сохраняя функции гена *vir*, сохраняли бы также способность к трансформации растительной ткани, не вызывая ее опухолевого перерождения. Селекцию трансформантов предполагалось осуществлять, используя доминантный селективный маркер (например, Km^r), введенный между концами Т-ДНК [30].

3.5.1. Регенерация на среде, индуцирующей побеги у трансформантов, полученных с помощью неонкогенных штаммов

Трансформацию проводили, как описано в разд. 3.2; популяцию трансформированных клеток обогащали, используя соответствующие селективные среды. Затем каллус, развившийся из этих трансформированных тканей, переносили на среду, ко-

торая в норме индуцировала регенерацию каллуса растения того же вида. Так, например, у *N. tabacum* можно вызвать регенерацию побегов, если культивировать каллус на агаризованной среде MSO, содержащей 1—2 мг/л 6-бензиламинопурина и 3% сахарозы при 25°C и интенсивности освещения 1000 люкс. В целом же высокое содержание в среде цитокинина относительно ауксина индуцирует регенерацию у многих видов. Если ткани загрязнены живыми агробактериями, в среду следует включить антибиотик. Регенерированные побеги отделяют от каллуса и переносят на среду MSO для того, чтобы на них могли сформироваться корни. Когда высота побегов достигнет 3—5 см, их можно перенести на компост и выращивать в теплице, следя за тем, чтобы в течение 1—2 недель проростки не страдали от недостаточной влажности воздуха. Для этого можно лоток с проростками накрыть чистым пластиковым мешком на несколько дней после того, как они были отделены от каллуса. Затем мешок разрезают вдоль по одной из сторон, чтобы уменьшить влажность, и когда растения окрепнут, снимают совсем. Можно также выращивать проростки до этой стадии во влажном инкубаторе.

3.5.2. Регенерация трансформированных побегов с помощью коинфекции *shooty*-мутантами и *onc*⁻-штаммами *A. tumefaciens*

Ti-плазмидные мутанты по генам *tms1* или *tms2* вызывают опухоли с характерным фенотипом (рис. 10). Экспрессия этих двух локусов в норме подавляет образование побегов в корончатых галлах, поскольку вызывает гиперпродукцию ауксинов в опухоли. Экспрессия гена *tmr* подавляет формирование корней из-за гиперпродукции цитокининов. В отсутствие экспрессии генов *tms1* или *tms2* или при пониженном ее уровне гиперпродукция цитокинина, обусловленная нормальной активностью гена *tmr*, стимулирует спонтанную регенерацию побегов в таких опухолях. Побеги, развивающиеся из опухолей, которые индуцированы *shooty*-мутантами октопинового типа, редко оказываются трансформированными. Следовательно, можно предположить, что трансформированные клетки в таких опухолях стимулируют регенерацию в окружающих нетрансформированных клетках. Это свойство часто используют для того, чтобы заставить регенерировать клетки, трансформированные *onc*⁻-векторами, путем коинфекции раневых участков *shooty*-мутантами (например, pGV2215) и *onc*⁻-штаммами *Agrobacterium* [16]. Трансформацию осуществляют так же, как это описано для *onc*⁺-векторов в разд. 3.2, используя смесь клеток *onc*⁻/*tms* в отношении 5/1. Регенерированные побеги отделяют от трансформированной ткани и анализируют на экспрессию трансформационных маркеров, как описано в разд. 5.

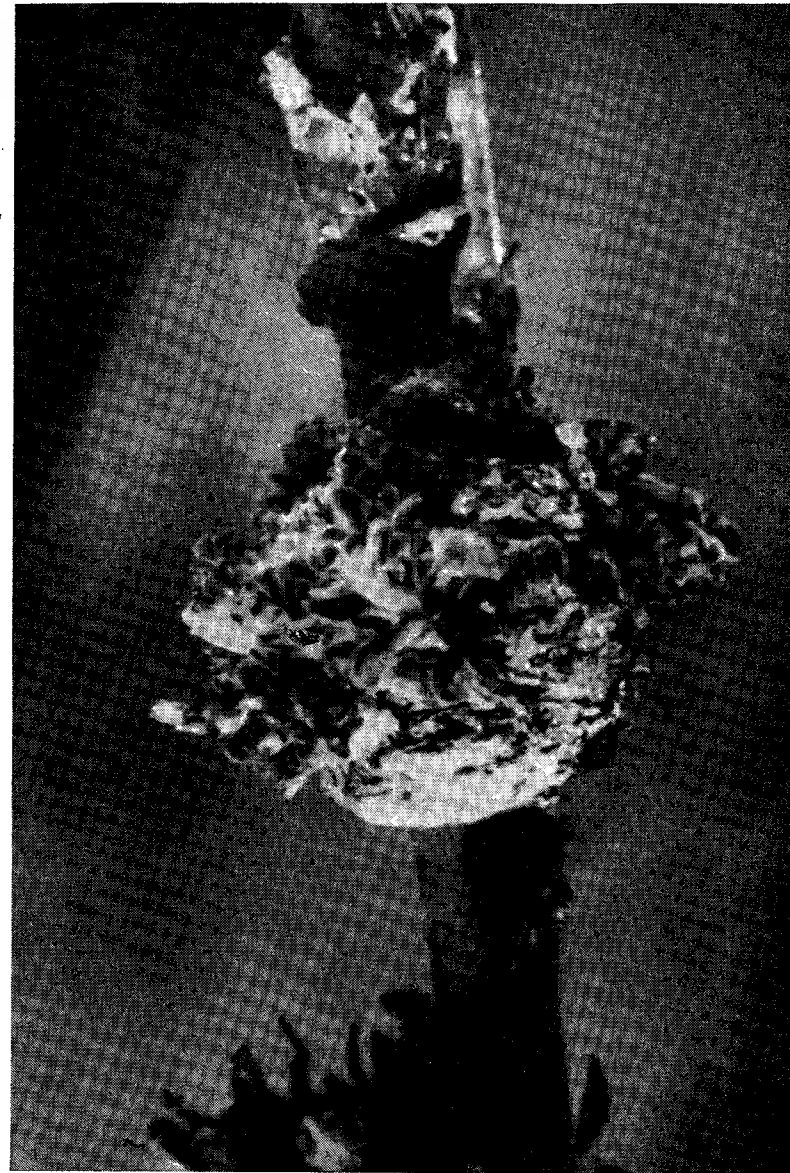


Рис. 10. Корончатый галл на растении *N. tabacum*, развившийся в результате инфекции мутантной по гену *tms* Ti-плазмидой октопинового типа. Отметим, что первичным ответом на инфекцию является пролиферация каллуса, а затем происходит развитие побегов. Если вводить мутантные по *tms* Ti-плазмиды в стерильные проростки, развиваются более многочисленные побеги. *tms*-Мутанты можно использовать в экспериментах по коинфекции с *onc*⁻-векторами.

Если в качестве маркера используют устойчивость к канамицину, трансформированные побеги можно отличить от не трансформированных, перенося их (когда в длину они достигнут около 1 см) на среду MSO, содержащую соответствующее количество канамицина (обычно 100 мкг/мл); в этих условиях развиваются только трансформированные побеги.

4. Выделение из растений ДНК и РНК

Получение препаратов ДНК и РНК — первоочередная задача при изучении структуры и экспрессии генов на молекулярном уровне. Не являются здесь исключением и генно-инженерные эксперименты с растениями, которые основаны на технологии рекомбинантных ДНК. Начнем с того, что изолированная ДНК необходима для создания банков геномных клонов; изолированная же РНК, в частности мРНК, требуется для создания библиотек кДНК, позволяющих, во-первых, идентифицировать полезные гены, а во-вторых, иметь в распоряжении зонды для поиска в геномных банках тех клонов, которые содержат эти гены. После того как интересующий ген удалось клонировать и его структура и организация в геноме достаточно изучены, можно ввести клонированный ген обратно в растение (если потребуется — в модифицированном виде) с помощью Ti-плазмидных векторов (см. разд. 2). Весьма важным моментом здесь являются идентификация и соответствующая генно-инженерная обработка промоторной области гена для обеспечения его экспрессии в трансформированном растении на достаточном уровне и на соответствующей стадии жизненного цикла. Выделение (путем клонирования кДНК) генов, активно экспрессирующихся в определенных органах и тканях растения на определенных стадиях развития, позволяет получить специфические промоторы для целей генной инженерии и, кроме того, углубляет наши знания о механизмах экспрессии генов в процессе развития организма. Процедуры выделения ДНК и РНК являются необходимым инструментом для анализа экспрессии экзогенной ДНК как в трансформированных растительных тканях, так и в целых регенерированных растениях.

4.1. Получение суммарной растительной ДНК

Описано много методик выделения ДНК из различных органов растений самых разных видов. В ряде случаев субклеточное фракционирование растительных тканей дает возможность осуществить специфическое выделение и клонирование ядерной, митохондриальной или хлоропластной ДНК. В данном разделе мы опишем обобщенную процедуру, которая широко применяется для выделения суммарной ДНК из различных растительных тканей и пригодна для работы с разными видами растений.

Затем мы вкратце коснемся процедур выделения ДНК из клеточных ядер, митохондрий и хлоропластов.

Главная проблема при выделении растительной ДНК заключается в эффективном разрушении клеточной стенки. К сожалению, те методы, которые используются для вскрытия клеток, вызывают фрагментирование ДНК. В связи с этим возникает необходимость искать компромисс между количеством выделенной ДНК и ее размером. Несколько облегчает задачу использование лиофильно высушенного материала (разд. 4.1.1). В то же время получение высокополимерной ДНК — это лишь полдела, поскольку растительные экстракты содержат большое количество полисахаридов, танинов и пигментов, которые в ряде случаев очень сложно отделить от ДНК. Трудности усугубляются тем, что некоторые полисахаридные загрязнения в препаратах ДНК практически невозможно выявить с помощью обычных неразрушающих аналитических методов. Эти загрязнения мешают количественному определению нуклеиновых кислот спектрофотометрическими методами, а также обуславливают аномальную кинетику гибридизационных процессов. Кроме того, они ингибируют многие рестрикционные ферменты и другие ферменты, участвующие в модификации ДНК. Таким образом, блот-гибридизационный анализ и клонирование растительной ДНК часто оказываются очень затруднены.

4.1.1. Препаративное выделение растительной ДНК

Высушивание в замороженном состоянии (лиофилизация) — наиболее подходящий метод хранения растительного материала, предназначенного для выделения ДНК. Он особенно удобен, когда планируется выделять ДНК из большого числа образцов растительной ткани: можно независимо провести необходимую предварительную обработку каждого образца, промыть и лиофилизировать их, после чего использовать в работе одновременно. Высушенный растительный материал может храниться несколько лет без заметного ухудшения качества выделяемой ДНК. В таком виде его можно эффективно измельчить сухим перемалыванием или растиранием, причем ДНК в негидратированном состоянии в меньшей степени подвержена механическому фрагментированию. Нуклеолитическая деградация ДНК также минимальна, потому что ее гидратация происходит мгновенно в присутствии хелатирующих агентов и детергентов, ингибирующих нуклеазную активность.

Методика, описанная в табл. 21, основывается на свойстве нуклеиновых кислот формировать устойчивые растворимые комплексы с детергентом цетилтриэтиламмонийбромидом (СТАВ) при высокой концентрации соли (0,7M NaCl). Если понизить солевую концентрацию до 0,4M NaCl, СТАВ-нуклеино-

Таблица 21. Выделение ДНК из лиофилизированного растительного материала

1. Смешайте 1 г лиофилизированной ткани с 4 г окиси алюминия (Sigma, type 305) и разотрите в ступке в очень тонкий порошок. Не будет преувеличением сказать, что этот этап — эффективное разрушение клеточной стенки — наиболее важен для получения ДНК.
2. Поместите порошок в полипропиленовый центрифужный стакан на 50 мл (например, Nalgene type 3100—0500 или эквивалентный). Добавьте 15 мл буфера для экстракции (ЕВ)¹⁾ и мягко перемешайте пластиковой палочкой до гомогенного состояния.
3. Закройте стакан и инкубируйте на водяной бане при 56 °С в течение 20 мин и время от времени мягко перемешивайте содержимое, покачивая стакан.
4. Охладите смесь до комнатной температуры. Следите за тем, чтобы температура не опускалась ниже 15 °С, так как СТАВ может выпасть в осадок.
5. Добавьте 15 мл смеси хлороформ: октанол (24:1, по объему), закройте стакан и аккуратно перемешайте, переворачивая стакан до образования однородной эмульсии²⁾.
6. Осадите клеточные обломки и разделите водную и органическую фазы центрифугированием при 8000 g (например, при 10 000 об/мин в роторе Sorval SS34, 8×50 мл) в течение 10 мин при 20 °С.
7. Отберите водную фазу (верхнюю) в чистый центрифужный стакан на 50 мл. Следите за тем, чтобы не захватить денатурированных белков, собранных в интерфазе.
8. Добавьте 1/10 объема (примерно 1,5 мл) 10%-ного (по весу) раствора СТАВ в 0,7 М NaCl. Мягко перемешайте и повторите экстракцию смесью хлороформ: октанол.
9. Стараясь не захватить частиц интерфазы, отберите водную фазу в подходящую стеклянную центрифужную пробирку (например, Correx) или высококачественные пробирки для низкоскоростного центрифугирования (Corning 16×125 мм Rutex).
10. Добавьте равный объем буфера для осаждения³⁾, мягко перемешайте и оставьте при комнатной температуре на 30 мин, чтобы осадок сформировался.
11. Откройте осадок при 1500 g в течение 10—15 мин при комнатной температуре. Не следует центрифугировать при больших значениях g или более продолжительное время, так как чрезмерно плотный осадок очень трудно растворить. Хорошим считается препарат, если осадок имеет белый цвет или слегка окрашен.
12. Осушите осадок, перевернув пробирку и поставив ее вертикально на лист фильтровальной бумаги. На этой стадии, если это необходимо, препарат можно оставить на ночь при 4 °С или сразу приступить к очистке ДНК. Соответствующая методика изложена в табл. 22.

¹⁾ Буфер для экстракции (ЕВ): 50 мМ трис-НСl pH 8,0; 0,7 М; NaCl 10 мМ ЭДТА; 1% (по весу) СТАВ (Sigma H-5882); 1% (по объему) 2-меркаптоэтанол (2МЕ). Компоненты буфера, за исключением 2МЕ, соединяют на мешалке с нагревом, следя за тем, чтобы раствор не вспенивался, и автоклавируют; 2МЕ добавляют после того, как буфер охладится до комнатной температуры.

²⁾ Работайте под тягой и время от времени приоткрывайте крышку, чтобы сбросить избыточное давление.

³⁾ Буфер для осаждения: 50 мМ трис-НСl pH 8,0; 10 мМ ЭДТА; 1% (по весу) СТАВ.

Таблица 22. Очистка растительной ДНК в градиенте плотности CsCl

1. Растворите осадок (см. п. 12 табл. 21) в 2,4 мл 1 М CsCl/EtBr¹⁾ на водяной бане при 56 °С. Этидиумбромид поможет проконтролировать, не осталось ли заметных количеств нуклеиновой кислоты на стенках центрифужного стакана. Обратите внимание, что, несмотря на присутствие 1 М CsCl/EtBr, непрозрачный осадок СТАВ растворяется легко и быстро — нуклеиновые кислоты растворяются медленнее.
2. Перенесите раствор в ультрацентрифужную пробирку для ротора Beckman VTi65 (или эквивалентного). Добавьте 2,9 мл 7 М CsCl/EtBr²⁾, закройте пробирку и перемешайте содержимое, осторожно переворачивая ее.
3. Центрифугируйте при 58 000 об/мин в течение 4 ч или при 40 000 об/мин в течение ночи (16 ч).
4. Визуализируйте полосу ДНК, используя источник длинноволнового УФ-излучения (320 нм) и отберите материал при помощи шприца на 1 мл, проколов пробирку сбоку. РНК осаждается на стенке пробирки; старайтесь не потревожить этот осадок.
5. Удалите этидиумбромид путем пятикратной экстракции изопропанолом (пропанол-2), насыщенным NaCl. Этидиумбромид уйдет в органическую фазу.
6. Удалите CsCl путем диализа против 2 л дистиллированной воды при 4 °С. Диализуйте в течение 24 ч на магнитной мешалке, меняя воду не менее 3 раз.
7. Измерьте концентрацию ДНК в растворе на спектрофотометре при длине волны 250 нм в кварцевой кювете (1 единица ОП=50 мкг/мл).
8. Добавьте 1/10 объема 3 М ацетата натрия и осадите ДНК двумя объемами охлажденного этанола при —20 °С в течение ночи.
9. Центрифугируйте в течение 3 мин на микроцентрифуге или 15 мин при 8000 g в силиконированной пробирке Correx на центрифуге Sorvall (или эквивалентной). Высушите осадок ДНК в вакууме и растворите в стерильной дистиллированной воде до желаемой концентрации. Раствор можно хранить при —20 °С; ДНК стабильна в течение нескольких лет. Можно также хранить ДНК в виде промытого осадка в 80%-ном этаноле.

¹⁾ 1 М CsCl/EtBr: 1 М CsCl; 50 мМ трис-НСl pH 8,0; 10 мМ ЭДТА; 0,2 мг/мл этидиумбромид.

²⁾ 7 М CsCl/EtBr: 7 М CsCl; 0,1% саркозил (Ciba Geigy NL 35); 0,2 мг/мл этидиумбромид.

вокислотный комплекс преципитирует, тогда как большая часть полисахаридов останется в растворе [31]. ДНК затем отделяют от РНК и СТАВ путем обычного ультрацентрифугирования в градиенте плотности CsCl с этидиумбромидом (EtBr). Для этого преципитат растворяют в высокосолеовом растворе (~1М) и наносят препарат на градиент CsCl с этидиумбромидом. Методика, описанная в табл. 22, предполагает использование пробирок для ротора Beckman VTi65 объемом 5,2 мл, однако все объемы можно пропорционально изменить применительно к любому имеющемуся в распоряжении высокоскоростному вертикальному или угловому ротору, так чтобы конечная плотность осталась прежней (1,55 г/мл).

Для препаративного выделения ДНК можно использовать и свежий растительный материал:

1. Промойте растительный материал в 70%-ном этаноле и

затем ополосните дистиллированной водой. Быстро заморозьте 10 г ткани в жидком азоте.

2. Поместите замороженную ткань в предварительно охлажденную ступку и разбейте пестиком крупные куски. Насыпьте в ступку 4 г окиси алюминия и быстро разотрите в тонкий порошок, пока ткань не оттаяла.

3. Перенесите гомогенат в центрифужный стакан на 50 мл, добавьте 0,2 мл 2-меркаптоэтанола и затем 10 мл (или больше, если это необходимо) двукратного буфера для экстракции (см. примечание к табл. 21), предварительно нагретого до 95°C. Немедленно перемешайте пластиковой палочкой.

4. Инкубируйте закрытый стакан на водяной бане при 56°C в течение 20 мин.

Далее следуйте методике, описанной в табл. 21, начиная с п. 4.

4.1.2. Ускоренный метод выделения ДНК для блот-гибризационного анализа трансформированных растительных тканей

Процедуру выделения ДНК с использованием СТАВ можно модифицировать применительно к конкретным задачам, например если возникла необходимость работать сразу со многими образцами тканей. Препараты ДНК, полученные по методике, изложенной в табл. 23, пригодны для блот-гибризационного анализа (см. разд. 5) без дополнительной очистки в градиенте плотности CsCl, что дает значительную экономию растительного материала, времени и позволяет обойтись без дорогостоящего оборудования для ультрацентрифугирования.

4.1.3. Определение концентрации ДНК в препаратах нуклеиновых кислот с использованием дифениламина

Дифениламинный реагент можно использовать для количественного анализа ДНК в грубых экстрактах растительных тканей благодаря его специфичности к тимидиновым остаткам (табл. 24). Высокая специфичность реакции в отношении тимидина позволяет легко обойти присутствие в препарате РНК. Кроме того, этот метод обеспечивает более высокую точность, чем определение оптической плотности раствора нуклеиновой кислоты при 260 нм. Разница в содержании нуклеиновой кислоты, определенном путем измерения ОП₂₆₀ и на основании дифениламинного теста, позволяет судить о количестве РНК в препарате.

4.2. Выделение ДНК из клеточных ядер, митохондрий и хлоропластов

Описанные методы выделения ДНК из клеточных ядер, митохондрий и хлоропластов позволяют работать с каллусом, листовым материалом, протопластами и отдельными клетками.

Таблица 23. Получение небольших количеств растительной ДНК для блот-гибризационного анализа по Саузерну

1. Отберите 0,1 г лиофилизированного каллуса или 0,07 г лиофилизированного листового материала (предварительно удалив центральные жилки). Разотрите ткань с 0,3 г окиси алюминия в небольшой ступке (диаметром 9 см). Если имеется достаточное количество материала, можно растереть большие куски ткани и затем уже отобрать необходимые количества для выделения ДНК.

2. Перенесите тонкоизмельченную растительную ткань в пробирку для микроцентрифуги. Добавьте 600 мкл буфера для экстракции (ЕВ)¹⁾ и мягко перемешайте пластиковой палочкой. Инкубируйте 10 мин при 56°C.

3. Добавьте 600 мкл смеси хлороформ:октанол (24:1), энергично встряхните и центрифугируйте 2 мин в микроцентрифуге, после чего перенесите водную фазу (верхний слой) в чистую пробирку для микроцентрифуги.

4. Промойте интерфазу (она образована денатурированными белками) 100 мкл буфера ЕВ, центрифугируйте, отберите водную фазу и объедините ее с основной водной фазой (см. п. 3).

5. Добавьте 1/10 объема 10%-ного раствора СТАВ (примерно 70 мкл) к объединенной водной фазе, перемешайте и повторите экстракцию смесью хлороформ:октанол.

6. Избегая загрязнения частицами интерфазы, отберите водную фазу и перенесите в чистую силиконированную центрифужную пробирку Ругех (например, 16·125 мм Corning). Добавьте равный объем буфера для осаждения¹⁾ (600 мкл), перемешайте и оставьте на 20 мин при комнатной температуре.

7. Центрифугируйте в настольной центрифуге при 2000 g в течение 15 мин. Удалите надосадочную жидкость и осадок подсушите на воздухе. Если осадок не удается собрать при указанном режиме, центрифугируйте в силиконированной пробирке Согех при 8000 g в течение 15 мин при 20°C.

8. Растворите осадок (СТАВ-нуклеиновокислотный комплекс) в 400 мкл 1 M NaCl. (При необходимости можно повысить температуру до 56°C.) Перенесите раствор в стерильную пробирку для микроцентрифуги.

9. Когда осадок полностью растворится, добавьте 2 объема (800 мкл) этанола, перемешайте и поместите на -20°C на ночь.

10. Осадите нуклеиновые кислоты центрифугированием в микроцентрифуге в течение 2 мин и промойте осадок 1 мл 65%-ного этанола в течение 1 мин. Удалите этанол и повторите промывку дважды, после чего промойте осадок аналогичным образом 85%-ным этанолом. В том случае, если осадок отделился от стенки пробирки, повторите центрифугирование. Промывка этанолом позволяет освободиться от СТАВ и делает препарат ДНК пригодным для обработки рестриктазами.

11. Высушите осадок в вакуумном эксикаторе и растворите в 85 мкл стерильной воды.

12. 10 мкл этого раствора можно использовать для определения концентрации нуклеиновой кислоты с помощью дифениламинного микротеста (см. табл. 24).

13. Соответственно разведите или сконцентрируйте препарат для получения требуемой концентрации (например, 200—500 мкг/мл). Полученная ДНК пригодна для обработки рестрикционными эндонуклеазами и блот-гибризационного анализа по Саузерну (см. разд. 5). Присутствующая в препаратах РНК не мешает анализу ДНК, поскольку в большинстве случаев она выходит из геля в ходе электрофореза.

¹⁾ См. примечание к табл. 21.

Таблица 24. Количественное определение ДНК с дифениламином

1. Приготовьте следующие растворы:
 А. 3N перхлорная кислота. Возьмите 49,2 мл перхлорной кислоты и добавьте дистиллированной воды до 200 мл. Полученный раствор перемешайте и храните в закрытой посуде в вытяжном шкафу. 3N перхлорная кислота — очень едкое вещество, поэтому при обращении с ней необходимо соблюдать особую осторожность. Раствор хорошо сохраняется при комнатной температуре в течение нескольких месяцев.
 Б. Раствор дифениламина. Приготовьте 4%-ный раствор дифениламина, содержащий 0,01%-ный паральдегид, в ледяной уксусной кислоте. Все компоненты этого раствора относятся к вредным веществам, в особенности дифениламин, поэтому работать следует в вытяжном шкафу:
 а) в конической колбе на 250 мл смешайте 20 мкл паральдегида и 198 мл ледяной уксусной кислоты;
 б) аккуратно взвесьте (используйте перчатки) 8 г дифениламина, внесите навеску в раствор паральдегида в уксусной кислоте и быстро оберните колбу алюминиевой фольгой, чтобы защитить раствор от света. Встряхивайте до тех пор, пока весь дифениламин не растворится. Этот раствор можно хранить в течение 6 нед при комнатной температуре в темноте; колбу или кислотницу с раствором следует держать в вытяжном шкафу.
 2. Смешайте компоненты реакционной смеси в указанном порядке (работайте под тягой); для этой цели удобно использовать пробирки для микроцентрифуги.
 140 мкл стерильной дистиллированной воды
 10 мкл раствора ДНК
 150 мкл 3N перхлорной кислоты
 180 мкл раствора дифениламина
 3. Закройте пробирку, перемешайте содержимое, перевернув ее несколько раз, и инкубируйте в темноте при 30°C в течение 16–20 ч. Важно точно выдерживать одинаковое время и температуру инкубации во всех экспериментах, иначе калибровочную кривую с использованием стандартных растворов ДНК придется строить каждый раз заново.
 4. Измерьте оптическую плотность раствора при 600 нм, используя микрокуветы, и соотнесите результат с калибровочной кривой, построенной с помощью серии стандартных разведений ДНК. Количественное определение ДНК следует проводить в присутствии отрицательного контроля (дистиллированная вода без ДНК) для установки нуля спектрофотометра.
 В интервале концентраций ДНК от 5 до 50 мкг/мл наблюдается линейная зависимость между концентрацией и OD_{600} . Для более концентрированных растворов линейная зависимость нарушается; в этом случае следует использовать соответствующие разведения.

Конкретные технические приемы различаются в разных лабораториях, но практически все методики включают измельчение свежего растительного материала, фракционирование субклеточных структур путем дифференциального центрифугирования, ДНКазную обработку интактных органелл, лизис, депротеинизацию и, наконец, очистку нуклеиновых кислот в градиентах плотности $CsCl/EtBr$. В данном разделе мы планировали дать общее описание методических приемов, которые могли бы послужить отправными точками в разработке конкретных экспериментальных процедур для выделения ДНК из того или иного источника.

Таблица 25. Выделение ядерной ДНК из свежих листьев или каллуса

1. Взвесьте 200 г ткани и промойте дистиллированной водой при 2°C в большом стеклянном стакане. Все последующие манипуляции выполняйте на льду (2–4°C), желательнее в холодной комнате.
2. Удалите средние жилки (если используете листья) и бритвой нарежьте ткань мелкими кусочками. Это удобно делать в большой чашке Петри (14 см).
3. Поместите кусочки ткани в 1 л стакан, залейте диэтиловым эфиром и выдержите 2 мин при помешивании.
4. Удалите эфир, прополощите ткань холодной дистиллированной водой и гомогенизируйте в 400 мл буфера для выделения ядер A^1 , используя аппарат Polytron; средний скоростной режим — 1 мин. Можно использовать и гомогенизатор типа Waring blender — два 5-минутных импульса при средней скорости².
5. Профильтруйте гомогенат через 4 слоя стерильного муслина и один слой Miracloth (Calbiochem) в 1 л стерильный стакан.
6. Перенесите гомогенат в большие стерильные центрифужные стаканы и центрифугируйте при 2000 g в течение 10 мин (4°C) для получения грубого препарата клеточных ядер³.
7. Полученные осадки ресуспендируйте в 25 мл буфера для промывки ядер B^3 , используя стерильный гомогенизатор Поттера (Jencons), и центрифугируйте в силиконированной стерильной пробирке Correx (Corning) в бакет-ротаторе при 2000 g в течение 10 мин при 4°C. Повторяйте промывку и центрифугирование до тех пор, пока препарат ядер не освободится от клеточных обломков (3–4 промывки).
8. Если требуется ультрачистый препарат, ядра можно дополнительно пропустить через ступенчатый градиент плотности Percol. Ресуспендируйте ядра в 7 мл буфера для выделения ядер А и наложите на ступенчатый градиент, приготовленный из 7 мл 35%-ного раствора и из 7 мл 80%-ного раствора Percol (Pharmacia) в буфере для выделения ядер А, в стерильной силиконированной пробирке Correx. Центрифугируйте в бакет-ротаторе при 8000 g в течение 30 мин при 4°C. Ядра, освобожденные от клеточных обломков, собираются в зоне между двумя ступенями градиента. Эту зону отбирают и разбавляют 25 мл буфера для выделения ядер А. Затем ядра осаждают центрифугированием (2000 g, бакет-ротатор) и один раз промывают в том же буфере. Очищенный препарат ядер хранят в соответствующем буфере⁴ при –70°C.
9. Ресуспендируйте ядра на льду в 5 мл специального буфера⁵ (этот буфер не содержит осмотически активного компонента), разрушите ядра с помощью встряхивателя: 10 циклов по 5 с в течение 5-мин, между циклами охлаждайте препарат во льду⁶.
10. Добавьте 0,1 мл 2-меркаптоэтанола, затем 5 мл 2Xбуфера для экстракции⁷, нагретого до 95°C, и немедленно перемешайте пластиковой палочкой. Далее проведите выделение ДНК, руководствуясь методикой, применяемой для лиофилизированного растительного материала (табл. 21, начиная со стадии 4).

¹) Буфер для выделения ядер А: 1 M сахараза; 10 mM трис-HCl pH 7,2; 5 mM MgCl₂; 2 mM 2-меркаптоэтанол (2MЭ). Раствор готовят и автоклавируют без 2MЭ; 2MЭ добавляют в стерильный буфер непосредственно перед использованием.

²) См. обсуждение этой стадии в тексте.

³) Буфер для промывки ядер В идентичен буферу А (см. примечание 1), но содержит дополнительно 0,3% Тритон X-100.

⁴) Буфер для хранения ядер: 250 mM сахараза; 20 mM HEPES pH 7,8; 5 mM MgCl₂; 1 mM дитиотрейтол; 50% глюкоза.

⁵) Буфер для лизиса ядер С: 10 mM трис-HCl pH 7,2; 10 mM ЭДТА; 5 mM 2MЭ; 0,5% тритон X-100.

⁶) Выход ДНК можно повысить за счет замораживания — оттаивания осадка ядер и протеазной обработки лизированных ядер в течение 30 мин при 37°C в 5 мл буфера для лизиса С, содержащего 500 мкг/мл прегидролизованной проназы.

⁷) См. примечание 1 к табл. 21.

Таблица 26. Выделение ДНК из хлоропластов и митохондрий

1. Гомогенизируйте 200 г растительного материала по методике, приведенной в табл. 25 (стадии 1—5), используя вместо буфера А буфер для выделения органелл F¹⁾.
2. Осадите ядра центрифугированием при 100 g в течение 10 мин при 4 °С.
3. Отберите надосадочную жидкость и центрифугируйте при 1800 g (4 °С, 10 мин), чтобы собрать хлоропласты. Осадок хлоропластов поместите на лед, а надосадочную жидкость перенесите в чистый центрифужный стакан.
4. Центрифугируйте при 10 000 g в течение 15 мин при 4 °С, чтобы собрать митохондрии.
5. Ресуспандируйте каждый из осадков (хлоропластов и митохондрий) в 25 мл ДНКазного буфера G²⁾ и инкубируйте на льду (0 °С) в течение 1 ч, время от времени перемешивая суспензии. Концентрация ДНКазы подбирается эмпирически так, чтобы исключить загрязнения препарата ДНК органелл ядерной ДНК. Успешно апробированный интервал концентраций ДНКазы составлял от 150 до 500 мкг/мл [33].
6. Добавьте ЭДТА (рН 8,0) до концентрации 10 mM, чтобы остановить реакцию.
7. Осадите хлоропласты и митохондрии центрифугированием соответственно при 1800 g и 10 000 g в течение 15 мин при 4 °С.
8. Ресуспандируйте каждый из осадков в 7 мл буфера F (при необходимости воспользуйтесь гомогенизатором Поттера) и проведите дополнительную очистку препаратов органелл путем центрифугирования в ступенчатом градиенте плотности Percol, как описано в табл. 25 (стадия 6).
9. Разбавьте митохондриальную фракцию и фракцию хлоропластов 25 мл буфера F и центрифугируйте их соответственно при 1800 g и 10 000 g в течение 15 мин при 4 °С.
10. Промойте полученные препараты, ресуспандировав каждый в 25 мл буфера H³⁾, и снова осадите органеллы центрифугированием.
11. Заморозьте осадки в спиртовой бане с сухим льдом и затем дайте им оттаять на водяной бане при 22 °С. Повторите цикл замораживание/оттаивание три раза и затем ресуспандируйте осадки в 5 мл буфера, используемого при выделении ядерной ДНК (это буфер для лизиса ядер C⁴⁾).
12. Проведите выделение ДНК, руководствуясь методикой выделения ядерной ДНК, описанной в табл. 25 (стадия 9 и 10).

¹⁾ Буфер для выделения органелл F: 300 mM маннитол; 50 mM трис-HCl pH 8,0; 3 mM ЭДТА; 0,1% бычьего сывороточного альбумина (БСА); 1 mM 2МЭ. Раствор готовят и автоклавируют без БСА и 2МЭ; эти компоненты добавляют в стерильный буфер непосредственно перед использованием.

²⁾ ДНКазный буфер G идентичен буферу F, но содержит дополнительно 13 mM MgCl₂ и 150—500 мкг/мл ДНКазы, добавляемой непосредственно перед использованием.

³⁾ Буфер для промывки органелл H: 150 mM NaCl; 100 mM ЭДТА pH 8,0.

⁴⁾ См. примечание 5 к табл. 25.

Выделение ядерной ДНК из листьев или каллуса описано в табл. 25. Возможно, для того, чтобы приспособить эту методику к конкретному растительному материалу, придется изменить длительность или мощностной режим гомогенизации (см. стадию 4). Аналогично может понадобиться изменение стадии 6, чтобы избежать заметного загрязнения препарата ядер хлоропластами. В ходе работы целесообразно проверять чистоту препарата ядер под микроскопом, окрашивая небольшие аликвоты акридиновым оранжевым (табл. 16Б).

«Высококачественные» транскрипционно активные ядра обычно удается выделить из растительных протопластов путем мягкого лизиса последних в гипертонических буферах [32]. Однако этот метод применим лишь в тех случаях, когда можно получить достаточное количество протопластов.

1. Выделяют протопласты, как это описано в табл. 14.

2. Ресуспандируют протопласты в буфере для выделения ядер [100 mM глицин; 1% гексиленгликоль; 2% сахараза; pH довести до 8,5 насыщенным раствором Ca(OH)₂] при 4 °С из расчета 1 мл буфера на миллион протопластов. Переносят суспензию в силиконированную пробирку Corax (30 мл).

3. Добавляют тритон X-100 до концентрации 0,1% и инкубируют во льду в течение 10 мин, мягко пипетируя суспензию с помощью пластиковой одноразовой пастеровской пипетки для полного лизиса протопластов.

4. Проверяют под микроскопом, все ли протопласты вскрылись, после чего осаждают ядра центрифугированием при 200g в течение 10 мин при 4 °С.

5. Далее выделяют ядерную ДНК, как это описано в табл. 25, начиная со стадии 5 и соответствующим образом уменьшив объемы используемых растворов.

Выделение ДНК из хлоропластов и митохондрий описано в табл. 26. Экспериментальные процедуры, используемые для получения ДНК из этих органелл, аналогичны тем, которые применяются при получении ядерной ДНК, и обычно включают разрушение растительных клеток, осаждение более тяжелой ядерной фракции, среднескоростное центрифугирование хлоропластов и затем высокоскоростное центрифугирование того же экстракта для получения митохондрий [33]. После промывки и ДНКазной обработки препаратов органелл приступают к выделению ДНК, используя в основном те же приемы, что и при выделении ДНК из клеточных ядер.

4.3. Выделение растительной РНК

Главная проблема при выделении РНК — обеспечить качественный выход чистой нуклеиновой кислоты при минимальной степени ее деградации. Принципиальными моментами здесь являются по возможности полное ингибирование рибонуклеазной активности и эффективное разрушение РНК-белковых комплексов (рибонуклеопротеинов, РНП). Опубликовано много методов выделения РНК из различных растительных источников; эти методы основаны на использовании либо фенола, являющегося мощным денатурирующим белки агентом, либо высококонцентрированных солевых растворов (например, 4M гуанидин-хлорид), в которых РНК остается в растворимой форме, а бел-

ки денатурируют и выпадают в осадок, либо растворов протеаз, гидролизующих белковые компоненты РНК [34].

Пожалуй, наибольшее распространение имеют методики, предусматривающие использование фенола, поэтому в данном разделе мы приводим обобщенный метод фенольной экстракции РНК, который можно применять для работы с самыми разными источниками растительного материала. Ингибирование рибонуклеаз — крайне важная проблема в любой процедуре выделения РНК. Ниже подчеркнуты узловые моменты, на которые следует обратить особое внимание в плане предотвращения деградации РНК внеклеточными ферментами.

1. Стеклопосуду необходимо простерилизовать либо в сушильном шкафу (150°C 3 часа), либо автоклавированием, либо погрузив в 0,5%-ный диэтилпиокарбонат и затем выдержав 5 мин при 100°C.

2. Все растворы, используемые в работе, следует по возможности автоклавировать.

3. Рабочее место должно быть чистым. Работать следует в резиновых перчатках разового пользования, чтобы предотвратить загрязнение рибонуклеазами, всегда присутствующими на коже рук.

4. РНК должна храниться в присутствии детергента или в этаноле при низких температурах (от -20 до -80°C).

5. Для работы следует использовать только особо чистые реактивы (например, выпускается сахароза, свободная от РНКаз).

Процедура выделения суммарной растительной РНК описана в табл. 27. Эта методика рассчитана на работу со свежим листовым материалом, полученным от широколиственных растений [36]. При использовании же других источников растительного материала — культур тканей, плодов и т. д. — следует соответствующим образом изменить количественные параметры процедуры (такие, как объемы растворов, навески ткани и т. п.), чтобы обеспечить эффективную экстракцию РНК и удобство работы.

Эукариотическую мРНК можно отделить от других видов РНК, присутствующих в препарате суммарной РНК, с помощью аффинной хроматографии — благодаря наличию у этих молекул на 3'-конце poly(A)-«хвоста» длиной 20—250 нуклеотидов. Для этих целей обычно используют oligo(dT)-целлюлозу или poly(U)-Сефарозу (коммерческие препараты). Активными элементами здесь являются 10—20-членные тимидиловые или уридилловые олигомеры, которые способны гибридизоваться с полиадениловыми цепями, если их длина составляет хотя бы 10—15 нуклеотидов; этим обеспечивается связывание poly(A)-содержащих РНК на колонках с указанными аффинными сорбентами в условиях высокой ионной силы. Рибосомная РНК и

Таблица 27. Получение суммарной растительной РНК

1. Приготовьте навески (приблизительно 5 г) свежего растительного материала и немедленно заморозьте в жидком азоте. Храните в нем до использования.

2. Одну-две навески замороженных листьев (5—10 г) разотрите в тонкую пудру в ступке, охлажденной жидким азотом. Периодически подливайте жидкий азот, чтобы ткань оставалась в замороженном состоянии.

3. Добавьте 50 мл буфера для гомогенизации¹⁾. Быстро разотрите материал, пока буфер оттаивает, и немедленно продавите суспензию через 4 слоя стерильного муслина (автоклавируемого) в коническую колбу на 250 мл.

4. Перенесите гомогенат в стерильные пробирки Correx (объемом 30 мл) и центрифугируйте при 8000 g в течение 10 мин при 4°C (ротор 8×50 мл).

5. Отберите надосадочную жидкость и профильтруйте ее через 4 слоя стерильного муслина в коническую колбу на 250 мл.

6. Добавьте 1/20 объема 10%-ного раствора SDS (конечная концентрация 0,5%).

7. Внесите равный объем водонасыщенного фенола, равный объем смеси хлороформ: изоамиловый спирт (24:1) и поставьте на магнитную мешалку на 20 мин при комнатной температуре. Скорость перемешивания должна быть минимально достаточной для эмульгирования смеси.

8. Перенесите эмульсию в 50 мл центрифужные пробирки Рухе и центрифугируйте в настольной центрифуге при 2500 g в течение 10 мин. Денатурированные белки сформируют интерфазу между органическим и водным слоями.

9. Отберите верхний (водный) слой и интерфазу в чистую 250 мл колбу и добавьте равный объем хлороформа. Перемешивайте в течение 10 мин, разделите фазы центрифугированием и отберите только водную фазу.

10. Повторяйте экстракцию хлороформом, пока белковая интерфаза не станет едва заметной (обычно достаточно одного цикла). Стараясь не захватить частиц интерфазы, отберите водную фазу в стерильные 30 мл пробирки Correx. Добавьте 1/20 объема 3 М ацетата натрия и осадите нуклеиновые кислоты двумя объемами этанола при -20°C в течение ночи.

11. Центрифугируйте при 8000 об/мин в течение 20 мин при 4°C в роторе 8×50 мл Sorvall SS34 (или эквивалентном).

12. Промойте осадок нуклеиновых кислот дважды 1—2 мл 3 М ацетата натрия pH 6,0 при 4°C (на льду), чтобы удалить этанол и ДНК.

13. Промойте осадок дважды 80%-ным этанолом, содержащим 0,1 М ацетата калия, и храните в этом же растворе при -20°C. Количество РНК можно определить спектрофотометрически, предварительно высушив осадок и растворив его в дистиллированной воде. Оптическую плотность полученного раствора следует измерять при 260 нм (1 ОП₂₆₀ = 40 мкг/мл²⁾).

¹⁾ Буфер для гомогенизации: 0,2 М трис-HCl pH 8,5; 0,2 М сахароза (свободная от РНКаз); 30 мМ ацетат магния; 60 мМ KCl. Раствор автоклавируют и хранят в жидком виде или замораживают при -20°C. Перед использованием добавляют поливинилпиролidon до 1% и 2-меркаптоэтанол до 0,31% (по объему).

²⁾ Чистоту препарата можно оценить спектрофотометрически, сняв спектр поглощения в УФ-свете: для чистой РНК — отношение ОП₂₆₀ : ОП₂₈₀ = 2,0.

тРНК не связываются с poly(U)-Сефарозой и oligo(dT)-целлюлозой и отмываются с колонки. Связанную мРНК затем элюируют низкосолевыми буферами. Процедура обогащения препарата РНК фракцией poly(A)+РНК описана в табл. 28.

Хорошим тестом на качество препарата РНК может служить его транскрипция *in vitro* в бесклеточной белок-синтезирующей

1. 25 г oligo(dT)-целлюлозы (Sigma) поставьте набухать в стерильном буфере для нанесения РНК¹⁾ при комнатной температуре.
2. Набейте в узкую часть стерильной силиконированной пастеровской пипетки небольшое количество стерильной силиконированной стекловаты. Заполните пипетку oligo(dT)-целлюлозой (примерно 1 мл). В качестве грубой оценки можно принять, что 1,0 г oligo(dT)-целлюлозы связывает из раствора 20—40 оптических единиц (при 260 нм) poly(A)⁺мРНК, т. е. 0,8—1,6 мг РНК.
3. Промойте колонку пятью объемами стерильной дистиллированной воды.
4. Промывайте колонку 0,3 М NaOH, пока элюат не будет иметь щелочную реакцию (обычно для этого необходимо пропустить 3—5 объемов щелочи).
5. Промойте колонку 10 объемами буфера для нанесения РНК.
6. Спиртовой осадок РНК соберите центрифугированием, удалите этанол и высушите РНК в вакууме.
7. Растворите осадок РНК в 0,5 мл стерильной дистиллированной воды и прогрейте раствор при 65° в течение 4 мин. Добавьте равный объем двукратного буфера для нанесения РНК и охладите препарат до комнатной температуры.
8. Медленно нанесите этот раствор на колонку с oligo(dT)-целлюлозой. Промойте колонку 5—10 объемами буфера для нанесения, собирая фракции по 1 мл в микроцентрифужные пробирки, пока ОП₂₆₀ в этих фракциях не приблизится к нулю.
9. Промойте колонку 4 объемами буфера для промывки²⁾.
10. Элюируйте poly(A)⁺мРНК пятью объемами колонки низкосолевого буфера для элюции³⁾, собирая фракции по 0,5 мл в стерильные микроцентрифужные пробирки. В каждой фракции измеряйте ОП₂₆₀, чтобы локализовать пик мРНК. Другой, более удобный способ элюции заключается в использовании перистальтического насоса и проточного регистрирующего спектрофотометра с малым объемом ячейки. Этот способ позволяет собирать непосредственно фракцию, содержащую элюируемый материал.
11. Объедините фракции, содержащие poly(A)⁺мРНК, в силиконированной пробирке Согех. Добавьте 1/10 объема 3 М ацетата натрия (рН 5,2), два объема этанола и поместите на ночь в морозильную камеру на —20 °С.
12. Осадите РНК центрифугированием в бакет-ротаторе при 8000 g в течение 30 мин при 0 °С. Осторожно удалите этанол и осадок промойте дважды 70%-ным этанолом.
13. Закройте пробирку парафином, затем пленку проколите в нескольких местах и подсушите РНК в вакууме в течение 5 мин. Растворите РНК в стерильной дистиллированной воде в концентрации 0,5 мг/мл, разделите на небольшие порции и храните при —70 °С. Можно также хранить мРНК в 70%-ном этаноле при —20 °С.

¹⁾ Буфер для нанесения РНК: 20 мМ трис-НСl рН 7,5; 0,5 М NaCl; 1 мМ ЭДТА; 0,05% SDS. Все компоненты, за исключением SDS, смешивают и автоклавируют. SDS готовят в виде 10%-ного (по весу) раствора и перед тем, как добавить в буфер, выдерживают в течение 1 ч.

²⁾ Буфер для промывки имеет тот же состав, что и буфер для нанесения, но вместо 0,5 М NaCl содержит 0,1 М NaCl.

³⁾ Низкосолевого буфера для элюции: 20 мМ трис-НСl рН 7,5 — 1 мМ ЭДТА — 0,02% SDS.

щей системе [34]. Оценить эффективность трансляции РНК особенно важно, если в дальнейшем планируется использовать этот препарат для получения кДНК. Размер выделенной РНК можно оценить с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии подходящих маркеров [34].

5. Изучение структурной организации и экспрессии чужеродной ДНК в растительной ткани

Осуществив трансформацию растительной ткани чужеродной ДНК с помощью того или иного метода, из описанных в разд. 3, можно приступить к изучению структурной организации и экспрессии этой ДНК в трансформированной ткани. Поскольку подобный анализ выходит за рамки частной задачи и соответствующие методы исследования, составляющие методическую базу молекулярной биологии в целом, подробно описаны в руководстве [15], мы ограничимся лишь их кратким обзором.

Для изучения структурной организации чужеродной ДНК, интегрированной в растительный геном, используют блот-гибридизационный анализ ДНК, выделенной ускоренным методом (разд. 4.1). По результатам блот-гибридизационных экспериментов можно судить о числе копий интегрированных последовательностей ДНК, о характере распределения в геноме множественных вставок (тандемная или расеянная организация) и о стабильности интегрированной ДНК в поколении F1 трансформированных регенерированных растений. Следует, однако, следить за тем, чтобы растительная ДНК была выделена из стерильной ткани, так как загрязнение полученного препарата ДНК *A. tumefaciens* может привести к ошибкам в трактовке результатов.

Транскрипционную активность чужеродной ДНК можно оценить при помощи дот-гибридизационного анализа, используя для этой цели препараты poly(A)⁺мРНК, полученные по методике, описанной в разд. 4.3. Недавно этим методом удалось продемонстрировать индукцию транскрипции гибридного гена со светозависимого промотора гена *ssRubisco*: было проведено сравнение препаратов poly(A)⁺РНК из ткани, выращенной на свету, и из ткани, выращенной в темноте [13]. Более детальное представление о характере транскрипции позволяет получить так называемый «Нозерн» (Nothern)-блот-гибридизационный анализ РНК. 5'- и 3'-концы транскриптов чужеродных генов можно определить при помощи S1-картирования; это, в частности, представляет интерес в плане идентификации промоторных областей с использованием делеционного мутагенеза.

Наиболее прямым подходом к изучению экспрессии чужеродных генов в трансформированных растительных тканях явля-

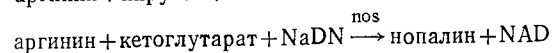
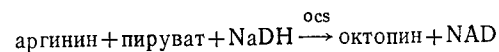
ется измерение активности ферментов, кодируемых данными генами. Соответствующий ферментный анализ включает оценку активности октопин- и нопалин-синтазы, а также активности продуктов генов *cat* и *nptII*. (В некоторых экспериментах благодаря использованию канамицина заранее осуществляется селекция в пользу экспрессии *nptII*.) Измерение активности ферментов позволяет оценить транскрипционную активность соответствующих генов, однако говорить о прямой корреляции здесь нельзя. В тех случаях, когда продукт изучаемого гена не обладает энзиматической активностью, его можно обнаружить с помощью так называемого «Вестерн» (Western)-блот-гибридизационного анализа или стандартных иммунологических методов, используя подходящие антитела.

Перечисленные методы и экспериментальные подходы были использованы в работе с трансформированными растительными тканями, растениями, регенерированными из этих тканей, и с потомством F1, полученным от этих регенерированных растений [30].

5.1. Определение октопин- и нопалин-синтазы

Эти реакции разработаны Оттенем и Шилперортом [37]; с их помощью удается продемонстрировать наличие октопин- или нопалин-синтазы в небольших образцах растительной ткани.

Схематически реакции можно записать следующим образом:



В действительности оба фермента предпочитают NADPH вместо NADH, однако NADPH в отличие от NADH в высокой концентрации ингибирует их активность; в реакции же используется именно высокая концентрация, поскольку многие другие ферменты, присутствующие в тканевом экстракте, конкурируют за эти кофакторы. Экспериментальная процедура описана в табл. 29; рис. 11 иллюстрирует определение октопин-синтазы.

Можно проводить совместное определение октопин- и нопалин-синтазы, используя смесь равных частей OCS- и NOS-буферов (см. примечания 2 и 3 к табл. 29). В некоторых случаях определение активности NOS бывает затруднено вследствие аккумуляции в ткани эндогенного нопалина. Нопалин удаляют на микроколоне с сефадексом G100.

1. Возьмите 0,75 мл микроцентрифужную пробирку и проколите дно тонкой иглой.

2. Положите на дно пробирки немного силиконированной стекловаты и заполните пробирку набухшим сефадексом G100.

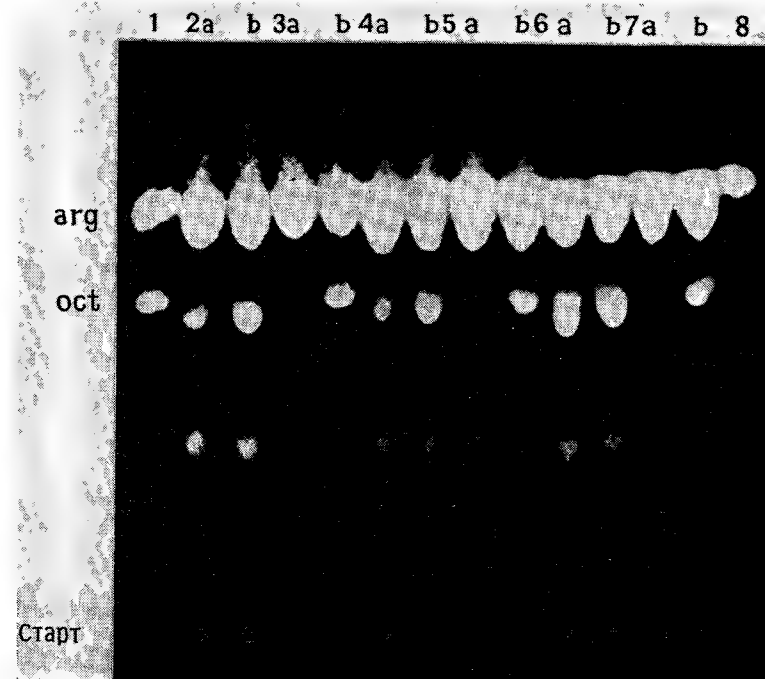


Рис. 11. Электрофореграмма, демонстрирующая наличие OCS-активности в некоторых трансформированных *in vitro* колониях *P. parodii*+pTiAch5. Дорожка 1 — аргининовый и октопиновый стандарты; 2 — аутентичный корончатый галл *P. parodii*+pTiAch5; 3 — нетрансформированные клетки *P. parodii*; 4—7 — гормоннезависимые трансформанты *P. parodii*; 8 — аргининовый стандарт. (a) Экстракты после ночной инкубации в присутствии 100 мМ аргинина. (b) То же, что (a), но в экстракты добавлен аутентичный октопин. В левой крайней дорожке видны стартовые точки октопинового (*oct*) и аргининового (*arg*) стандартов.

3. Поместите пробирку с сефадексом в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку и центрифугируйте в течение 1 мин на малой скорости в настольной центрифуге, снабженной бакет-ротором.

4. Удалите элюат, нанесите 50 мкл растительного экстракта и повторите центрифугирование. Элюат будет обладать NOS-активностью, но не будет содержать нопалина.

Процедура, описанная в табл. 29, имеет ряд недостатков. Так, концентрацию раствора NADH необходимо проверять перед использованием. Некоторые компоненты реакционной смеси для определения октопин-синтазы конденсируются в продукты, обладающие такой же подвижностью, как и октопин, что приводит к ошибочному выводу о наличии ферментативной активности. Приготовление растворов занимает очень много времени. Ниже

Таблица 29. Определение октопин- и нопапин-синтазы

1. Поместите примерно 10 мг растительной ткани в микроцентрифужную пробирку и определите точный вес образца. Добавьте равный объем буфера для экстракции¹⁾ и разотрите ткань на льду стеклянной палочкой.
2. Центрифугируйте в микроцентрифуге в течение 2 мин в холодной комнате (4°C) и снова поместите пробирку на лед. Не оставляйте экстракты на льду дольше 15 мин до постановки реакции, так как энзиматическая активность быстро снижается. В то же время ткань или экстракт можно заморозить без существенной потери энзиматической активности.
3. Прилейте равный объем надосадочной жидкости к OCS- или NOS-буферу^{2), 3)} (например, 5+5мкл) и инкубируйте при комнатной температуре в течение 30—60 мин.
4. Нанесите 5 мкл реакционной смеси в точку на бумаге 3ММ (Whatman) или MN214 (Machereg Nagel, 516 Duren, FRG). Рядом нанесите маркер — метиленовый зеленый. Образцы следует наносить на расстоянии 6 см от края бумажной полосы, имеющей в длину 20 см. Не забудьте нанести контрольные точки — октопиновый или нопапиновый стандарт (Sigma).
5. Поместите бумагу в прибор для электрофореза с соответствующим буфером⁴⁾. Электрофорез ведите при напряженности поля 20 в/см, пока маркер не дойдет до края бумаги (примерно 1 ч при 400 В).
6. Высушите бумагу и окрасьте электрофореграмму фенантрехиноном⁵⁾. Для визуализации пятен используйте длинноволновый УФ-свет. Всегда подвешивайте бумагу таким образом, чтобы шлейф аргининовых пятен был направлен в сторону (или вниз) от октопин-нопапиновых пятен. Это может оказаться полезным, если понадобится повторное окрашивание, на что укажет интенсивность аргининовых пятен. Эксперимент по определению OCS иллюстрирует рис. 11.

¹⁾ Буфер для экстракции готовится из раствора: 100 мМ трис-HCl pH 8,0; 500 мМ сахараза; к этому раствору добавляют стерилизованные фильтрованием аскорбиновую кислоту и цистеин-HCl до концентрации 0,1%. Полный буфер хранят замороженным в виде 1 мл аликвот.

²⁾ Буфер для определения OCS: 200 мМ фосфат натрия pH 6,8; 30 мМ аргинин-HCl; 75 мМ пируват натрия; 20 мМ NADH. Этот раствор готовят по частям следующим образом. Сначала делают буфер R×O, который хранят в замороженном состоянии (250 мМ фосфат натрия pH 6,8; 40 мМ аргинин-HCl; 100 мМ пируват натрия). Для приготовления полного OCS-буфера 75 мл R×O смешивают с 10 мл 200 мМ раствора NADH в 15 мл воды. Раствор NADH готовят непосредственно перед использованием из сухого вещества, хранящегося при -20°C. Приготовьте небольшое количество 200 мМ водного раствора NADH и определите спектрофотометрически реальную концентрацию (1 М NADH обуславливает ОП₃₄₀—6220). Скорректируйте объем с учетом обнаруженной погрешности.

³⁾ Буфер для определения NOS: 200 мМ фосфат натрия pH 6,8; 60 мМ аргинин-HCl; 60 мМ α-кетоглутарат; 16 мМ NADH. Сначала готовят буфер R×N: 250 мМ фосфат натрия pH 6,8; 80 мМ аргинин-HCl; 80 мМ α-кетоглутарат. Затем смешивают 75 мл буфера R×N, 8 мл 200 мМ NADH и 17 мл воды.

⁴⁾ Можно использовать любой из трех буферов для электрофореза: а) 15% уксусная кислота; 5% HCOOH, pH 1,8 (нопапин локализуется вблизи старта у положительного полюса, затем — октопин и аргинин); б) 50 мМ Na₂B₄O₇ pH 9,2 (октопин и нопапин хорошо разделяются, но октопин может мигрировать вместе с некоторыми растительными компонентами. Расположение пятен такое же, как в первой системе); в) 50 мМ цитрат натрия pH 5,0 (октопин также может плохо отделяться от загрязнений. Порядок расположения пятен относительно старта у положительного полюса следующий: октопин — нопапин — аргинин).

⁵⁾ Красящий раствор готовят из двух компонентов, которые можно хранить при -20°C: 0,02% ный фенантрехинон в 95%-ном этаноле и 10%-ный NaOH в 60%-ном этаноле. Равные объемы этих растворов смешивают и используют в течение 1—2 ч. Фенантрехинон очень токсичен — работайте под тягой!

приведен альтернативный метод, в основу которого положено наблюдение, что лимитирующим звеном описанных реакций, по-видимому, являются пируват и α-кетоглутарат, а не аргинин. Этот метод вместо определения ферментативной активности в

грубом экстракте позволяет выявлять накопление опинов в интактной ткани.

1. Поместите небольшое количество ткани (приблизительно 10 мг) в микроцентрифужную пробирку и добавьте 35—50 мкл среды культивирования (так, чтобы примерно половина всей ткани была покрыта жидкостью, а половина осталась на воздухе). В качестве среды культивирования для анализа опс⁺-ткани используют среду MSO (табл. 9), в которую добавлен аргинин до концентрации 10 мМ и либо пируват до 10 мМ (определение OCS), либо α-кетоглутарат до 10 мМ (определение NOS). Для анализа опс⁻-ткани используют среду MSP1.

2. Инкубируйте в течение ночи при комнатной температуре.

3. Удалите среду культивирования, подсушите ткань на фильтровальной бумаге и перенесите ее в чистую пробирку.

4. Заморозьте ткань и выдержите 10 мин при -20°C, чтобы облегчить ее измельчение. Затем измельчите ткань и центрифугируйте в микроцентрифуге в течение 5 мин.

5. Далее продолжайте эксперимент, начиная со стадии 4, табл. 29.

Этот метод столь же надежен и чувствителен, как и определение ферментативной активности, а растительная среда может храниться при 4°C в течение месяца.

5.2. Определение хлорамфениколацетилтрансферазы

Этот аналитический метод широко используется в экспериментах, связанных с трансформацией клеток млекопитающих, и подробно описан в гл. 6 настоящего тома. Коротко он заключается в следующем.

1. 100 мг трансформированной ткани растирают в микроцентрифужной пробирке стеклянной палочкой в 100 мкл буфера, содержащего 500 мМ сахарозу; 250 мМ трис-HCl pH 7,5; 1% аскорбиновую кислоту; 0,5 мМ лейпептин (Sigma); 10 мМ ЭДТА; 1% цистеин-HCl, 0,5 мМ ацетил CoA и 1 мкКи [¹⁴C] хлорамфеникола (50 мкКи/мМ⁻¹, NEN).

2. Инкубируют при 37°C в течение 30 мин и затем центрифугируют в микроцентрифуге в течение 10 мин. Хорошим положительным контролем здесь может служить обработанный ультразвуком экстракт *E. coli*, несущий pBR325 и, следовательно, ген *cat*.

3. Экстрагируют реакцию смесь этилацетатом и затем концентрируют упариванием.

4. Проводят распределительную хроматографию экстракта в тонком слое силикагеля в системе хлороформ:метанол (95:5), позволяющей разделить ацетилованную и неацетилованную формы хлорамфеникола. Визуализацию хроматограмм осуществляют путем радиоавтотрафции.

5.3. Определение неомицинфосфотрансферазы

Ген *nptII* широко используется в качестве селективного доминантного маркера, позволяющего отбирать трансформированные растительные клетки по их устойчивости к канамицину. С помощью гель-фильтрации высокого разрешения грубых растительных экстрактов Эррера-Эстрелья с сотр. [7] показали, что трансформированные растительные ткани, обнаруживающие устойчивость к канамицину, действительно содержат фермент, который способен фосфорилировать канамицин и имеет такой же профиль элюции, как фермент, присутствующий в контрольном экстракте из *E. coli*, несущей ген *nptIII kn'*.

Относительно недавно разработан новый ускоренный метод качественного и количественного определения малых количеств NPT в грубых клеточных экстрактах [41]. Метод основывается на электрофоретическом отделении фермента от других белков и определении его активности по фосфорилированию *in situ* антибиотика канамицина. Канамицин и [α - 32 P] АТФ — субстраты NPT — вводят в агарозный гель, в который диффундируют фракционированные белки. Образующийся в результате ферментатической реакции фосфорилированный канамицин переносится на фосфоцеллюлозную ионообменную бумагу P81 и визуализируется по радиоактивной метке с помощью радиоавтографии. Описанный метод позволяет детектировать 1 нг активного фермента как в прокариотических, так и в эукариотических источниках; кроме того, он может продемонстрировать различия в размерах белков, обладающих данной ферментативной активностью. Подробно метод изложен в табл. 30.

5.4. Определение дигидрофолатредуктазы

Не так давно появилось сообщение о том, что вирус мозаики цветной капусты (CaMV) может служить вектором для введения небольших фрагментов ДНК в растительные клетки [42]. Две области генома CaMV — открытые рамки считывания (CORFs) II и VII, — по всей видимости, не играют существенной роли в инфекционности вируса. Поэтому Бриссон с сотр. [42] заместили CaMV ORF II плазмидным геном дигидрофолатредуктазы (*dhfr*), который обеспечивает устойчивость *E. coli* к триметоприму, а у эукариотических клеток — к метотрексату. Гибридная вирусная ДНК устойчиво воспроизводилась в клетках репы, причем ген *dhfr* экспрессировался в виде функционального фермента. Наличие соответствующей ферментативной активности было продемонстрировано с помощью изотопного теста (табл. 31), основанного на включении 32 P в ДНК в присутствии метотрексата.

Таблица 30. Определение неомицинфосфотрансферазы

1. Прозектрагируйте 100 мг растительной ткани 20 мкл буфера А¹⁾, растерев образец в микроцентрифужной пробирке²⁾.
2. Добавьте 1/10 объема экстракта ткани корончатого галла (1 г ткани в 350 мкл буфера В³⁾, инкубация при 4 °С в течение 1 ч.).
3. Центрифугируйте, чтобы удалить твердые частицы, добавьте бромфеноловый синий до 0,002% и нанесите на 10%-ный неденатурирующий полиакриламидный гель⁴⁾ (по 40 мкл в лунку). Так как фермент движется в геле недалеко от фронта красителя, следите за тем, чтобы краситель не вышел из геля.
4. По окончании электрофореза дважды промойте гель водой и уравновесьте буфером С⁵⁾.
5. Перенесите гель в стеклянную кювету и залейте 1,5 мм слоем 1%-ной агарозы, содержащей канамицинсульфат и [α - 32 P] АТФ⁶⁾. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 30 мин.
6. Положите поверх геля один лист бумаги Whatman P81, затем 2 листа Whatman 3MM и стопку фильтровальной бумаги. Перенос длится 1—3 ч.
7. Отделите от стопки лист P81, тщательно удалите приставшие частицы агарозного геля и промойте 5 раз по 5 мин в горячей воде (80—90°).
8. Оберните этот лист P81 упаковочной пленкой «Cling Film» или «Saranwrap» и экспонируйте на рентгеновскую пленку, используя усиливающие экраны. Время экспозиции — от нескольких часов до недели при —70 °С.

¹⁾ Буфер А: 40 мМ ЭДТА; 150 мМ NaCl; 100 мМ NH₄Cl; 10 мМ трис-HCl pH 7,5; 2,31 мг/мл ДТТ; 0,12 мг/мл лейпептина; 0,21 мг/мл ингибитора трипсина.

²⁾ Не забудьте поставить контрольные реакции с нефракционированным растением и с экстрактом из *E. coli*, содержащим NPT. Экстракт из *E. coli* получают так. Выращивают клетки в 20 мл среды LB до титра 4×10^8 /мл, центрифугируют и ресуспендируют в 50 мкл буфера А. «Озвучивают» клетки, чтобы получить грубый экстракт, и снова центрифугируют, чтобы удалить клеточные обломки. Перед нанесением на гель надсадочную жидкость в различных разведениях (в буфере А) добавляют к экстракту ткани корончатых галлов в буфере В. Окрашивание кумасси голубым неденатурирующего полиакриламидного геля, содержащего экстракт *E. coli* и известные стандарты, позволяет оценить количество NPT в экстракте.

³⁾ Буфер В: 30 мМ NaCl; 15 мМ NH₄Cl; 3 мМ MgCl₂; 5 мМ ЭДТА; 3 мМ трис-HCl pH 7,5; 0,031 мг/мл ДТТ; 36 мг/мл сахарозы.

⁴⁾ 10%-ный неденатурирующий гель готовят из следующих компонентов. А. Разделяющий гель: 10 мл 30%-ного акриламид/бисакриламида (29:1); 12,2 мл H₂O; 7,5 мл 1,5 М трис-HCl pH 8,8; 10 мкл TEMED; 200 мкл 10%-ного персульфата аммония. Б. Концентрирующий гель: 1,5 мл 30%-ного акриламид/бисакриламида (29:1); 1,25 мл 1 М трис-HCl pH 6,8; 7 мл H₂O; 10 мкл TEMED; 30 мкл 10%-ного персульфата аммония. 50%-электрофорезный буфер готовят, растворяя 288 г глицина в 60 г триса в 400 мл воды.

⁵⁾ Буфер С: 67 мМ трис-малат pH 7,1; 42 мМ MgCl₂; 400 мМ NH₄Cl.

⁶⁾ Агарозный гель для насланивания готовят следующим образом: смешивают при 45 °С 15 мл буфера С, 15 мл расплавленной (45 °С) 2%-ной водной агарозы, 100 мкМ [α - 32 P] АТФ (5—7000 Ки/мМ), 40 мкл канамицинсульфата (25 мг/мл). Этого количества достаточно для насланивания на гель площадь 200 см². Использование для электрофореза полиакриламидных блоков большей площади требует пропорционального увеличения количества агарозного геля. Добавление более 50 мкл раствора канамицинсульфата не повышает чувствительности метода, тогда как увеличение содержания АТФ увеличивает чувствительность.

6. Перспективы на будущее

В настоящее время главным препятствием на пути использования генетической инженерии растений для улучшения качества сельскохозяйственных культур является относительно слабая разработка систем культивирования растительных тканей и регенерации растений. Кроме того, остается нерешенной пробле-

Таблица 31. Определение дигидрофолатредуктазы

1. Инкубируйте 5 г растительной ткани в 5 мл не содержащей фосфата среды MSO (в случае *опс*⁺-ткани) или MSP1 (в случае *опс*⁻-ткани) (см. табл. 9) в присутствии 0,1 мг/мл метотрексата (Sigma) при 25°C в течение 22 ч в темноте, используя ротационную качалку (мягкий режим)¹⁾.

2. Удалите среду и замените ее свежей средой, содержащей метотрексат и 35 мкКи [³²P] ортофосфата (Amersham). Продолжайте инкубацию в течение еще 22 ч.

3. Удалите среду, промойте ткань три раза в 15 мл фосфатного буфера и заморозьте в жидком азоте.

4. Гомогенизируйте ткань в 0,5–1,0 мл раствора: 50 mM NaCl; 10 mM ЭДТА; 1% саркозил; 10 mM трис-HCl pH 7,5. Затем гомогенат экстрагируйте дважды фенолом.

5. Осадите нуклеиновые кислоты изопропанолом и ресуспендируйте в 50 мкл буфера для ДНК (10 mM трис-HCl pH 7,5; 0,1 mM ЭДТА; 5 mM NaCl), содержащего 20 мкг/мл РНКазы.

6. Инкубируйте 1 ч при 37°C, добавьте 450 мкл раствора протеиназы K (200 мкг/мл) в 0,10 SDS и инкубируйте еще в течение 1 ч.

7. Экстрагируйте смесь дважды фенолом и осадите изопропанолом. Затем ресуспендируйте осадок в 50 мкл буфера для ДНК и проведите электрофорез образца в 1%-ном агарозном геле.

8. Окрасьте гель этидиумбромидом и сфотографируйте, чтобы зафиксировать картину фракционирования растительной ДНК²⁾. Затем экспонируйте с гелем рентгеновскую пленку; радиоавтограф покажет включение ³²P в ДНК.

¹⁾ В качестве контрольных образцов используйте неинфицированную ткань, инкубируя ее в присутствии метотрексата и без него (чтобы показать ингибирование синтеза ДНК), а также инфицированную растительную ткань при такой же постановке эксперимента.

²⁾ Относительная интенсивность полос ДНК может служить в качестве приблизительной оценки количества ДНК, полученного из той или иной растительной ткани. Более точное количественное определение ДНК проводят с помощью дифениламинового теста (табл. 24).

ма обеспечения стабильной интеграции и экспрессии чужеродных генов на нужной стадии развития. Здесь требуется дальнейшее углубленное изучение растительных промоторов.

Следует отметить также и то, что мы пока не можем однозначно определить, какие гены следует клонировать и использовать для направленного изменения свойств сельскохозяйственных растений. Сейчас мы ограничиваемся отдельными генами, кодирующими запасные белки (возможно, с их помощью удастся улучшить качество растительного белка) или ферменты, способные расщеплять гербициды. Такие сложные, свойственные растениям функциональные особенности, как солевая устойчивость или образование клубеньков (у азотфиксирующих видов), познаны нами далеко не полностью, так что пока мы не можем выделить ген или, что более вероятно, генный кластер, кодирующий эти функции, и перенести соответствующую генетическую информацию в клетки растения другого вида. Нам также еще предстоит понять молекулярные основы взаимоотношений хозяина и патогена, прежде чем мы сможем оперировать

генами, ответственными за устойчивость к инфекционным агентам.

В ряде случаев улучшение хозяйственных характеристик растений может осуществляться за счет удаления определенных генов, которые снижают урожай, воздействуя на процесс биосинтеза белка. Поскольку не всегда существует возможность селекции таких мутантов или отбора вариантов на уровне культуры ткани, представляется заманчивой возможность заменять соответствующие аллели дикого типа на клонированные мутантные аллели с использованием трансформации и гомологичной рекомбинации.

Благодарности

Мы благодарим Энн Депикер, приславшую нам модернизированную методику определения опинсинтаз и методические разработки экспериментов Джентской (Gent) лаборатории по коинфицированию. Мы признательны Крису Смитсу за предоставление методики очистки РНК, Эрику Вьмеру, принявшему участие в разработке аналитического метода выделения Ti-плазмидной ДНК, Луису Эррера-Эстрелья, предоставившему неопубликованную рестрикционную карту pLGVneo1103, и Юреку Пашковскому, разработавшему метод определения NPT в применении к растительным тканям. В заключение мы благодарим Глена Милхауза, выполнившего фотографические работы, и Элен Розье за перепечатку рукописи.

Литература

1. Kosuge T., Meredith C. P., Hollaender A. (eds.). Genetic Engineering of Plants: An Agricultural Perspective, published by Plenum Press, New York, 1983.
2. Caplan A., Herrera-Estrella L., Inze D., Van Haute E., Van Montagu M., Schell J., Zambryski P. Science (Wash.), 222, 815 (1983).
3. Akiyoshi D. E., Klee H., Amasino R. M., Nester E. W., Gurdon M. P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 5994 (1984).
4. Schröder G., Waiffenschmidt S., Weiler E. W., Schröder J. Eur. J. Biochem., 138, 387 (1983).
5. Wang K., Herrera-Estrella L., Van Montagu M., Zambryski P. Cell, 38, 387 (1984).
6. Stachel S. (1984), submitted for publication.
7. Herrera-Estrella L., De Block M., Messers E., Hernalsteens J.-P., Van Montagu M., Schell J. EMBO J., 2, 987 (1983).
8. Hooykaas-Van Slogteren G. M. S., Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A. Nature, 311, 763 (1984).
9. Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Van Montagu M., Schell J. EMBO J., 2, 2143 (1983).
10. Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., Schell J. Nature, 303, 209 (1983).
11. Horsch R. B., Fraley R. T., Rogers S. G., Sanders P. R., Lloyd A., Hoffman N. Science (Wash.), 237, 496 (1983).

12. Bevan M. W., Flavell R. B., Chilton M.-D. *Nature*, **304**, 184 (1983).
13. Herrera-Estrella L., Van den Broeck G., Maenhaut R., Van Montagu M., Schell J., Timko M., Cashmore A. *Nature*, **301**, 115 (1984).
14. Herrera-Estrella L. (1984), в печати.
15. Maniatis F., Fritsch E. F., Sambrook J. (eds.). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1982.
16. Zambryski P., Herrera-Estrella L., De Block M., Van Montagu M., Schell J. In: *Genetic Engineering, Principles and Methods*, Setlow J. and Hollaender A. (eds.), Plenum Press, New York, Vol. 6, p. 253 (1984).
17. Koncz C., Kreuzaler F., Kalman Zs., Schell J. *EMBO J.*, **3**, 1029 (1984).
18. Van Haute E., Joos H., Maes M., Warren G., Van Montagu M., Schell J. *EMBO J.*, **2**, 411 (1983).
19. Klapwijk P. M. Ph. D. Thesis University of Leiden, Holland, 1979.
20. Garfinkel D. J., Simpson R. B., Ream L. W., White F. F., Gordon M. P., Nester E. W. *Cell*, **27**, 143 (1981).
21. Currier T. C., Nester E. W. *J. Bacteriol.*, **126**, 157 (1976).
22. Hoekema A., Hirsch P. P., Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A. *Nature*, **303**, 179 (1983).
23. Figurski D. H., Helinski D. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1648 (1979).
24. Marton L., Wullems G. J., Molendijk L., Schilperoort R. A. *Nature*, **277**, 129 (1979).
25. Vasil I. K. (ed.). *International Review of Cytology, Supplements 11A and 11B 'Perspectives in Plant Cell and Tissue Culture'*, published by Academic Press, 1980.
26. Steinbiss H. H., Broughton W. J. In: *Int. Rev. Cytol., Supplement 16 'Plant Protoplasts'*, Giles K. L. (ed.), Academic Press, p. 191, 1983.
27. Draper J., Davey M. R. In: *Plant Cell Culture Technology*, Yeoman M. M. (ed.), Blackwells, Oxford, 1984, in press.
28. Draper J., Davey M. R., Freeman J. P., Cocking E. C., Cox B. J. *Plant and Cell Physiol.*, **23**, 451 (1982).
29. De Greve H., Leemans J., Hernalsteens J. P., Thia-Toong L., De Beuckeleer M., Willmitzer L., Otten L., Van Montagu M., Schell J. *Nature*, **300**, 752 (1982).
30. De Block M., Herrera-Estrella L., Van Montagu M., Schell J., Zambryski P. *EMBO J.*, **3**, 1681 (1984).
31. Murray M. G., Thompson W. F. *Nucleic Acids Res.*, **8**, 4321 (1980).
32. Hadlaczky G., Bisztray G., Praznovszky T., Dudits D. *Planta*, **157**, 278 (1983).
33. Chilton M. D., Saiki R. K., Yadav N., Gordon M. P., Quetier F. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 4060 (1980).
34. Taylor J. M. *Annu. Rev. Biochem.*, **48**, 681 (1979).
35. Slater R. J. In: *Techniques in Molecular Biology*, Walker J. M., Gastra W. (eds.), Croom Helm Ltd., Beckenham, UK, p. 113, 1983.
36. Smith C., personal communication.
37. Otten L. A. B. M., Schilperoort R. A. *Biochim. Biophys. Acta*, **527**, 497 (1978).
38. Vieira J., Messing J. *Gene*, **19**, 259 (1982).
39. Murashige T., Skoog F. *Physiol. Plant*, **15**, 473 (1962).
40. Caboche M. *Planta*, **149**, 7 (1980).
41. Reiss B., Sprengel R., Will H., Shaller H. *Gene* (1984), in press.
42. Brisson N., Paszkowski J., Penswick J. R., Gronenborn B., Potrykus I., Hohn T. *Nature*, **310**, 511 (1984).

Р-ЗАВИСИМАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ КЛЕТОК ЗАРОДЫШЕВОГО ПУТИ ДРОЗОФИЛЫ

Роджер Э. Кэресс

1. Введение

Из всех многоклеточных организмов наиболее полно геном изучен у дрозофилы. Значительный прогресс в познании механизмов генной экспрессии у дрозофилы обусловлен прежде всего тем, что исследователи имели возможность рассматривать ту или иную проблему, используя как генетический, так и молекулярно-биологический подходы. Появление методов трансформации клеток зародышевого пути существенно расширило поле нашей деятельности. В результате за довольно короткий срок, минувший со времени опубликования Рубином и Спрадлингом [1, 2] разработанного ими метода введения в геном дрозофилы чужеродных генов с помощью векторов на базе Р-элементов, наши знания о сигнальных и регуляторных механизмах, ответственных за временной и пространственный контроль генной экспрессии, дозовую компенсацию и эффект положения, значительно углубились.

Неполный список генов или генетических элементов (таких, например, как промоторные последовательности), которые удалось экспрессировать в клетках дрозофилы путем Р-зависимой трансформации, включает *rosy* [1], *white* [3], *actin* [4], гены личиночного сывороточного белка [5], гены желточного белка [6], ДОФА-декарбоксилазы [7], белка хориона [1, 8], алкогольдегидрогеназы [9] и ген белка теплового шока *hsp70* [10]. Кроме того, в дрозофиле была осуществлена экспрессия трех бактериальных генов под контролем промоторов дрозофилы. Это гены хлорамфениколацетилтрансферазы (*CAT*) [5], *lacZ* *E. coli* [8, 10] и ген устойчивости к неомицину (*neo^R*) [11].

2. Принцип метода

Процедура трансформации базируется на свойствах Р-элементов и их поведении в условиях гибридного дисгенеза.

2.1. Р-элементы и гибридный дисгенез

Мы ограничимся лишь самым поверхностным описанием Р-элементов и их роли в гибридном дисгенезе. Для более подробного ознакомления с предметом отсылаем читателя к двум прекрасным обзорам [12, 13].

Термином «Р-М гибридный дисгенез» называют синдром коррелирующих генетических aberrаций, который наблюдается у потомства F_1 (так называемых дисгенных гибридов), полученного от скрещивания самцов определенных линий *Drosophila* (называемых Р-линиями) с самками некоторых других линий (так называемых М-линий). Отмеченные aberrации включают стерильность, повышенную частоту мутаций, хромосомные перестройки и рекомбинацию у самцов. Примечательно, что они возникают почти исключительно в клетках зародышевого пути мух F_1 .

Р-элементы являются медиаторами гибридного дисгенеза. В совокупности они представляют собой семейство мобильных генетических элементов, которые присутствуют во всех Р-линиях мух и отсутствуют в большинстве (но не во всех) М-линиях. Существует два больших класса Р-элементов: недефектные и дефектные. Недефектные Р-элементы, вероятно, кодируют по меньшей мере два функционально активных белка — транспозазу, необходимую для их собственной транспозиции и транспозиции дефектных элементов, и фактор, ограничивающий транспозицию Р-элементов, называемый обычно фактором, определяющим цитотип. Когда Р-элементы находятся в стабильном состоянии, говорят о Р-цитотипе — это по сути клеточная среда Р-линий мух. Природа Р-цитотипа неизвестна; можно предполагать, что в этих клетках присутствует некий репрессор, скажем аналогичный репрессору бактериофага лямбда. При оплодотворении функциональные Р-элементы, присутствующие в геноме сперматозоидов, попадают в ядра яйцеклеток М-цитотипа (это клеточная среда М-линий мух, характеризующаяся отсутствием функциональных Р-элементов). Здесь они дестабилизируются и мобилизуются для транспозиции, подобно тому как при зиготной индукции лямбда-профаг внезапно дерепрессируется, попадая в бактериальную клетку, не содержащую репрессора. В норме описанные события происходят при скрещивании самцов Р-линий с самками М-линий (дисгенное скрещивание). При реципрокном скрещивании (самцов М-линий и самок Р-линий) или скрещивании $P \times P$ Р-элемент остается «привязанным» к Р-цитотипу яйцеклетки и феномен гибридного дисгенеза не проявляется. Закономерности наследования и экспрессии цитотипов представляют большой интерес, однако эта тема выходит за рамки нашего обзора.

2.2. Структура Р-элементов

О'Хар и Рубин [14] клонировали и определили первичную структуру нескольких Р-элементов. Все Р-элементы были разделены ими на два класса: большие — длиной 2,9 т. п. н. (недефектные автономно реплицирующиеся элементы) и малые — дли-

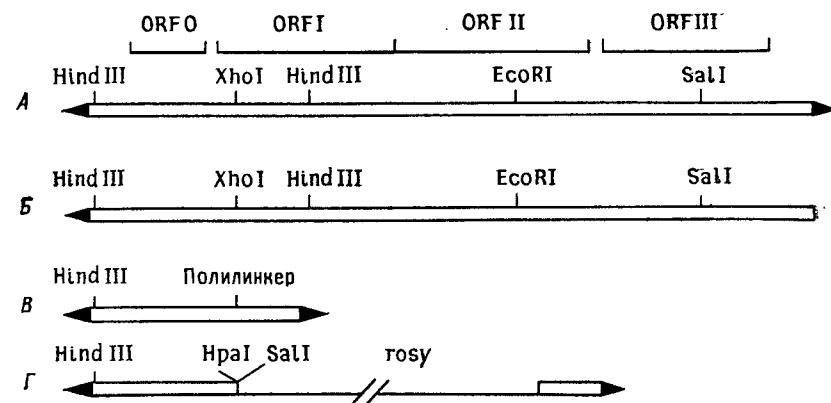


Рис. 1. Схематическое изображение структуры Р-элементов, используемых в экспериментах по трансформации. А. Интактный автономный элемент длиной 2,9 т.п.н., присутствующий в плазмиде рл 25,1 [14]; сверху показаны четыре открытые рамки считывания (ORF), а также основные рестриционные сайты. Б. Р-элемент из плазмиды рл 25,1 в. Обратите внимание на делецию области правого инвертированного повтора. В. Обобщенная структура векторов на основе Р-элемента серии Carnegie; показано расположение участка клонирования, содержащего уникальные рестриционные сайты. Г. Вектор Carnegie 20, содержащий селективный маркер (ген *rosy*) и несколько уникальных рестриционных сайтов для клонирования желаемого фрагмента ДНК.

ной 0,5—1,6 т. п. н. (дефектные элементы, которые, по-видимому, произошли от полных элементов за счет утраты части внутренних последовательностей). 2,9 т.п.н.-элементы имеют 4 большие открытые рамки считывания в одной из цепей (рис. 1), которые, как предполагают, кодируют единственный полипептид, обладающий транспозазной активностью [15]. Элемент фланкирован обращенными повторами длиной в 31 нуклеотид; для транспозиции элемента необходимо присутствие обоих концевых повторов в интактном виде [15, 16]. Малые, дефектные Р-элементы утратили часть нуклеотидных последовательностей, принадлежащих открытым рамкам, и, следовательно, не могут кодировать транспозазу. Однако эти элементы сохранили инвертированные концевые повторы, благодаря чему они также способны перемещаться по геному, используя транспозазу, синтез которой обеспечивается полным 2,9 т. п. н.-элементом.

2.3. Р-элементы и трансформация клеток зародышевого пути

Функциональная целостность Р-элемента длиной 2,9 т. п. н. и его способность трансформировать клетки зародышевого пути были прямо продемонстрированы Спрадлингом и Рубином [2]. Эти авторы предположили, что введение клонированного интактного Р-элемента в зародышевые клетки развивающегося эмб-

риона М-линии имитирует условия гибридного дисгенеза, когда Р-элементы, присутствующие в геноме сперматозоидов, внезапно оказываются в клеточной среде М-цитотипа. Было показано, что 2,9 т. п. н.-элемент (находящийся в составе бактериальной плазмиды) может транспозироваться из плазмиды в хромосомную ДНК клеток зародышевого пути мух. Для того чтобы проверить предположение о том, что транспозаза, кодируемая интактным, автономным Р-элементом, способна обеспечить перемещение и дефектного элемента, авторы повторили описанный эксперимент, осуществив совместную инъекцию полного (2,9 т. п. н.) элемента и дефектной копии, в которую с помощью генно-инженерных манипуляций был предварительно встроен ген дикого типа *rosy* (*ry*) — структурный ген ксантиндегидрогеназы, одного из ферментов биосинтетического пути пигментов глаза. Эмбрионы, в которых вводили эту смесь дефектных и недефектных Р-элементов, были гомозиготными мутантами по гену *ry*. Часть потомства, полученного от подвергнутых инъекции мух, имела фенотип *rosy*⁺. В дальнейшем было показано, что их геном содержит стабильно интегрированные Р[*rosy*]-транспозоны. Плазмидных последовательностей, которые были бы ассоциированы с интегрированными транспозонами, обнаружено не было. Это свидетельствует в пользу предположения, что транспозиция Р-элементов осуществляется при участии обращенных концевых повторов.

3. Планирование экспериментов по трансформации

3.1. Необходимость генетического маркера

Можно смело утверждать, что наличие фенотипически различимого селективного маркера, кодируемого транспозированной ДНК, — необходимое условие успешной работы. Если бы Рубин и Спрадлинг исследовали потомство своих мух на предмет интегрированных Р-элементов методом блот-гибридизации ДНК, им вряд ли удалось бы выявить трансформантов. В действительности эти авторы проводили селекцию трансформантов на основе фенотипических изменений, обусловленных экспрессией новых генов, привнесенных в геном в составе Р-элементов. Это позволило им обнаруживать трансформантов даже в тех случаях, когда их доля в потомстве подвергнутых инъекции мух составляла менее 0,5% [1].

Исследователю следует прежде всего решить, какой маркер должен нести фрагмент ДНК, предназначенный для генетического переноса, — скажем, экспрессирующий какой-нибудь примечательный фенотип или же определенный селективный признак. Если исследуемый фрагмент ДНК сам по себе кодирует подобные функции, прямой отбор трансформантов не представ-

ляет трудности. Может, однако, возникнуть задача изучения измененного гена или только части гена (например, промоторной области), когда экспрессия инъекционной ДНК не гарантируется или же интересующая последовательность не детерминирует примечательный фенотип. Тогда исследуемый фрагмент ДНК соединяют в составе одной молекулы с геном, экспрессирующим примечательный фенотип или селективный признак. Любой ген, который, будучи представлен в одной дозе, обеспечивает экспрессию соответствующих функций (т. е. доминантный аллель), может служить маркером для трансформации. При работе с гомозиготными мутантами эту роль может играть ген дикого типа. Наиболее широко в качестве маркеров для трансформации используются два гена — это структурные гены алкогольдегидрогеназы (*Adh*) и *rosy* (*ry*). Позже для этой цели стали с успехом использовать бактериальный ген лекарственной устойчивости *neo*^R, состыкованный с промотором из генома дрозофилы [11]. Каждый из этих маркеров имеет свои достоинства и недостатки, о чем мы расскажем ниже.

3.2. Маркеры для трансформации

3.2.1. Ген *rosy* (структурный ген ксантиндегидрогеназы)

Ген *rosy* (*ry*, хромосома 3R, локус 52,0) был клонирован Бендером с сотр. [17]. Это первый ген, который удалось ввести в геном дрозофилы с помощью Р-зависимой транспозиции; сейчас это один из наиболее распространенных маркеров, используемых при различных генетических манипуляциях. Мухи-реципиенты могут быть гомозиготными по любой из нескольких известных *ry*-мутаций, например *ry*⁴² (эти линии, а также большинство других стандартных линий мух описаны в работе Линдсли и Грелла [18]). Эти мухи имеют коричнево-красные, почти коричневые глаза, что позволяет при небольшом увеличении легко отличать их от мух дикого типа, с глазами кирпично-красного цвета. Р[*ry*]-элемент, содержащий ген *rosy* в составе 7,3 т. п. н.-*Hind*III-фрагмента ДНК, обуславливает развитие у мух-трансформантов глаз, окрашенных по дикому типу. Даже весьма низкая функциональная активность гена *ry* (1—5% от нормальной активности гена дикого типа) способна обеспечить появление видимых фенотипических изменений у *ry*-мутантов: цвет глаз у таких мух становится близким к цвету глаз мух дикого типа. Таким образом, даже в том случае, если Р[*ry*]-элемент внедрится в неблагоприятную с точки зрения трансформации область генома (например, в гетерохроматиновый участок), особь, несущая этот элемент, будет идентифицирована как трансформант. Кроме того, экспрессия гена *ry* в любых клетках влияет на формирование глазных пигментов,

поэтому, даже оказавшись в таком хромосомном окружении, которое ограничит его экспрессию лишь некоторыми клеточными типами, он все равно обеспечит развитие *ry*⁺-окраски глаз. Наконец, следует упомянуть о том, что существуют хорошие балансеры третьей хромосомы, такие, как *TM3* [8, 15], которые несут *EMS*-индуцированные *ry*-аллели и поэтому особенно удобны для характеристики трансформантов и балансирования хромосом с интегрированными элементами (о балансерах и их использовании в экспериментальной практике более подробно говорится в разд. 7.1).

Один из недостатков *rosy* как маркера транспозонов связан с тем, что 7,3 т. п. н-фрагмент расщепляется большинством рестрикционных эндонуклеаз, узнающих гексануклеотидные последовательности (исключения составляют, в частности, *Sall*, *HpaI* и *KpnI*). Это создает известные трудности в манипулировании с плазмидами, несущими ген *ry*. Кроме того, сам ген, его транскрипт и регуляторные последовательности еще недостаточно полно охарактеризованы.

3.2.2. Ген алкогольдегидрогеназы [*Adh*]

Ген *Adh* (хромосома 2L, локус 50,1) клонирован и хорошо изучен [19—21]. Подобно *rosy*, это один из первых генов, успешно транспозированных в геном дрозофилы [9]. Известны многочисленные мутанты *Adh*⁻, которые могут служить реципиентными линиями. Мутантный фенотип проявляется в повышенной чувствительности к этанолу: 6%-ный раствор этанола токсичен для *Adh*⁻-мух, тогда как единственный аллель дикого типа способен обеспечить их совершенную защиту. Таким образом, можно проводить селекцию трансформантов на среде, содержащей этанол, и не заниматься индивидуальным отбором потомков, что заметно экономит время. Известны хорошие балансеры второй хромосомы, например *SyO*, несущие аллель *Adh*⁻ [9]. Функциональный ген локализуется в 3,5 т. п. н.-*XbaI*-фрагменте, который не содержит участков узнавания для рестриктаз *EcoRI*, *SacI*, *BglII* и *PvuI*, что делает этот маркер достаточно удобным для генно-инженерных манипуляций.

В то же время ген *Adh* не имеет внешнего фенотипического проявления, поэтому приходится тратить больше усилий на дальнейшее картирование и скрещивание *Adh*-трансформантов. Кроме того, селекция по устойчивости к этанолу может привести к утрате трансформантов с пониженной активностью гена *Adh*.

3.2.3. Устойчивость к неомицину

В настоящее время в распоряжении исследователей появились и многие другие генетические маркеры. Каждый новый ген, который удастся клонировать и затем обратно ввести в ге-

ном дрозофилы, становится потенциальным маркером и в принципе может быть использован в дальнейших экспериментах по генетическому переносу. Не так давно был сконструирован вектор на основе Р-элемента, который несет бактериальный ген неомициновой устойчивости (*neo*^R), поставленный под контроль промотора гена белка теплового шока дрозофилы [11]. Трансформанты, в геноме которых присутствует этот элемент, приобретают устойчивость к препарату G418 при его концентрации в пище 1 мг/мл; в норме этот препарат токсичен для личинок мух. Указанный маркер транспозонов имеет то очевидное преимущество, что обеспечивает экспрессию селективного признака практически на любом генетическом фоне, включая и дикий тип. Следовательно, реципиентная линия мух может не нести никаких специальных мутаций, однако здесь мы сталкиваемся с такими же ограничениями, что и в случае *Adh*. Трансформанты с низким уровнем экспрессии гена могут быть потеряны при селекции, а дальнейшие манипуляции с трансформантами, основывающиеся на особенностях их фенотипа, предполагают использование химических средств, а не простого визуального контроля.

Если ставится задача отбора трансформантов, экспрессирующих транспозированные гены на «нормальном» уровне, вероятно, имеет смысл использовать маркеры, обеспечивающие трансформантам устойчивость к различным химическим агентам, — такие, как *Adh* или *neo*^R. С другой стороны, если интерес представляет каждый трансформант, включая и такие особи, которые экспрессируют введенный ген с теми или иными «искажениями» (например, благодаря эффекту положения), целесообразно использовать в качестве маркера ген *rosy*.

3.3. Векторы на основе Р-элементов

Выбрав подходящий генетический маркер, исследователь приступает к следующему этапу работы — клонированию интересующего гена в векторной плазмиде, сконструированной на базе Р-элемента. Подобные векторы являются производными дефектных Р-элементов, клонированных в бактериальных векторах. Они сохраняют все нуклеотидные последовательности, необходимые для транспозиции, а также несут дополнительные рестрикционные сайты, позволяющие вводить интересные фрагменты ДНК в состав транспозона (т. е. в область, ограниченную обращенными повторами). *Цис*-функциональные последовательности, необходимые для придания Р-элементу транспозиционной компетентности, охарактеризованы пока недостаточно полно. Эти зоны действительно включают инвертированные повторы, однако не исключено, что они распространяются и за их пределы, по крайней мере на левом фланге [см. 16]. Еще не

обнаружено ни одного мобильного дефектного Р-элемента, который имел бы делецию в области 100 нуклеотидов, локализуемых у его левой границы [14].

Описан целый ряд Р-векторов [16], которые содержат внутри области, ограниченной инвертированными повторами, синтетические полилинкеры. Это векторы серии *Carnegie*, несущие уникальные сайты рестриктаз *Pst*I, *Sal*I, *Bam*HI, *Eco*RI и др. (рис. 1B); структурной основой этих векторов служит плазида рUC8. Вектор *Carnegie* 20 (рис. 1, Г) имеет в своем составе Р-элемент, в который введен 7,3 т. п. н-*Hind*III-фрагмент ДНК, содержащий ген *rosy*. Вектор несет уникальные сайты рестриктаз *Sal*I и *Hpa*I, которые могут использоваться в качестве сайтов клонирования ДНК. Позднее были сконструированы векторы, маркированные *neo*^R [11].

Принятая в настоящее время номенклатура рекомбинантных Р-элементов [22] предусматривает использование квадратных скобок для обозначения концевых обращенных повторов элемента. Генетический материал, заключенный между этими повторами, обозначается соответствующими символами внутри скобок. Согласно этой номенклатуре, вектор *Carnegie* 20 имеет обозначение P[*rosy*], а, например, транспозон, несущий ген *Adh*, — P[*Adh*].

3.4. Потребность во вспомогательном (хелперном) элементе

Как мы уже упоминали в разд. 2.3, дефектные рекомбинантные Р-транспозоны способны перемещаться по геному только в присутствии некоего *транс*-функционального фактора, который кодируется недефектными Р-копиями. Поэтому сначала в качестве хелперного элемента в экспериментах по трансформации использовали 2,9 т. п. н-элемент клона рл25.1 (один из двух интактных Р-элементов, которые были клонированы и секвенированы О'Харом и Рубином [14]). Однако, будучи интактным автономным элементом, он сам мог транспозироваться в геном реципиентной мухи наряду с рекомбинантным Р-элементом. Двойная интеграция — дефектного и недефектного элемента — в один реципиентный геном обуславливает генетическую ситуацию, эквивалентную той, которая возникает при гибридном дисгенезе. В результате рекомбинантный Р-элемент оказывается генетически нестабильным: происходят множественные акты выщепления его из генома и перемещения в новые хромосомные локусы. Нестабильные трансформанты довольно трудно должным образом охарактеризовать; необходимы повторные скрещивания и отбор, чтобы генетическими методами удалить интегрированный хелперный элемент из генома. Чтобы уменьшить риск двойной интеграции, методика трансформации предусматривала использование смеси соответствующих плазмид (содержащих

исследуемый рекомбинантный Р-элемент и содержащих хелперный элемент) с молярным отношением 5-1 [1].

Более удобный вариант хелперного элемента ввели в практику эксперимента Кэресс и Рубин [15]. Этот элемент, клонированный в виде плазмиды рл25.7wc (wc — от англ. *wings-clipped*), позволил обойти упомянутые трудности. Он экспрессирует транспозазу, однако сам не способен транспозироваться ввиду того, что область между 23 и 31 нуклеотидами правого инвертированного повтора удалена. Наличие только одного функционального концевого повтора лишает этот Р-элемент мобильности. Было показано, что новый хелперный элемент столь же эффективен, как и рл25.1, и в то же время пока не известно ни одного случая, когда бы он встроился в реципиентный геном.

При использовании в трансформационных экспериментах рл25.7wc молярное соотношение дефектного рекомбинантного элемента и хелперного элемента следовало бы изменить. К сожалению, специальных исследований по определению их оптимального количественного соотношения проведено не было (см. обсуждение экспериментов в разд. 4.6).

3.5. Выбор реципиентной линии мух для трансформации

При выборе реципиентной линии мух для планируемой инъекции Р-элемента следует учитывать два основных требования. Во-первых, это должна быть М-линия, и желательно, чтобы у этой М-линии отсутствовали любые последовательности, способные гибридизоваться с Р-элементами. Во-вторых, фенотип этих мух должен обеспечивать возможность идентификации особей, экспрессирующих ген, введенный в составе рекомбинантного Р-элемента (см. разд. 3.2).

Хотя большинство лабораторных линий мух в действительности относится к М-типу, известно, что некоторые из них содержат в геноме несколько копий (а в ряде случаев много копий) дефектных Р-элементов [23, 24]. Эти эндогенные копии могут снижать эффективность трансформации за счет конкуренции с инъецированным рекомбинантным Р-элементом за транспозазу. Кроме того, они могут создавать трудности при последующем молекулярном анализе трансформантов. Наиболее простой способ обнаружить наличие Р-элементов в геноме мух, рассматриваемых в качестве потенциальных реципиентов, — анализ их ДНК методом блот-гибридизации [28].

Трансформированная особь фенотипически должна отличаться от нетрансформированных мух. Если интересующий ген имеет внешнее фенотипическое проявление и есть уверенность в том, что он сохраняет интактную структуру в составе Р-вектора, этот ген можно вводить непосредственно в хозяйскую особь, которая является гомозиготным рецессивным мутантом по дан-

ному гену. Критерием отбора трансформантов в этом случае будет восстановление нормального фенотипа. В тех случаях, когда рекомбинантная конструкция на основе Р-элемента внешне не проявляется или же экспрессия исследуемого гена не гарантируется (например, при изучении активности промотора в серии делеционных мутантов), трансформантов отбирают с помощью маркерного гена, например *Adh* или *rosy*; реципиентная линия мух должна при этом нести мутацию соответствующего эндогенного гена. И наконец, если селекцию проводят на основе лекарственной устойчивости, используя в качестве генетического маркера ген *neo^R*, хозяйская линия может иметь любую генетическую конституцию, включая дикий тип.

4. Подготовка препаратов для микроинъекций

4.1. Оборудование и материалы для микроинъекций

Лабораторный микроскоп (увеличение 10—30×)

Инвертированный микроскоп (увеличение 150—200×) с выключенным или заэкранированным источником света. Желательно иметь столик с охлаждением или работать в комнате, где температура поддерживается на уровне 18°C (однако это не обязательно).

Микроманипулятор и держатель микроинструмента. Необходимость этих приборов очевидна, если учесть, что перемещение иглы требуется ограничить интервалом в несколько десятков микрон.

Предметные стекла

Покровные стекла

Часовой или глазной пинцет

Хлорная известь (гипохлорит натрия)

Двусторонняя липкая лента (Scotch или Sellotape)

Электрический аппарат для вытягивания игл, например Vertical pipet puller модель 700C

Микрокапилляры, желательны с внутренним филаментом

Такие капилляры выпускаются фирмами W. P. Instruments и Clark Electromedical Instruments. Капилляры необходимо промыть фильтрованным абсолютным этанолом и высушить

Drierit, хлористый кальций, силикагель или аналогичный осушитель

Пластиковый шприц на 25 или 50 мл

Пластиковые трубки для соединения шприца с держателем микроинструмента и иглой

Чашки Петри разового пользования

Фильтровальная бумага

Масло Halocarbon серия 700 или Votalef grade 10S

Камеры для сбора яиц — флаконы или небольшие пеналы
Поддоны для сбора яиц, агар с добавлением виноградного сока или мелассы (2,5% агар)

4.2. Сбор ранних эмбрионов

Полное описание жизненного цикла *Drosophila*, а также методов разведения и культивирования мух можно найти в книге [25].

Здоровая популяция мух гарантирует хороший выход яиц. Наибольшее количество здоровых яиц откладывают молодые самки (в возрасте 3—7 дней). Особенно это характерно для мух *gu*-линий, плодовитость которых резко падает по достижении ими недельного возраста.

Перед тем как приступить к сбору яиц, выдержите только что вылупившихся мух в течение 2—3 дней на свежей среде, обогащенной дрожжевой пастой. Мух можно содержать в небольшом пенале, куда следует поместить поддон для сбора яиц. Альтернативный путь — поместить несколько сотен мух в сосуд с двумя отверстиями, одно из которых закрывают поддоном для сбора яиц, а другое — ватной пробкой, обеспечивающей достаточно эффективную вентиляцию. Можно закрыть одно из отверстий шелковой сеткой и затем поставить сосуд этим отверстием на поддон с кормом: самки будут откладывать яйца сквозь сетку, и для сбора следующей порции яиц достаточно перенести сосуд на новый поддон. Важно лишь следить за тем, чтобы сосуд оставался чистым. По мере того как стенки сосуда загрязняются выделениями мух и частицами дрожжевой массы, переносимыми на их лапках, эти стенки становятся более предпочтительными местами для откладывания яиц и конкурируют с поддоном.

Поддоны для сбора яиц заполняют массой из виноградного сока и агара или же из мелассы и агара и в центре помещают небольшое количество свежей дрожжевой пасты. Поскольку шероховатая поверхность обычно стимулирует откладывание яиц, гладкий агар можно слегка поцарапать иглой, чтобы побудить мух откладывать яйца в образовавшиеся бороздки и тем самым облегчить сбор яиц.

Самки мух откладывают яйца в соответствии со своими циркадными ритмами, которые, однако, часто не совпадают с порядком дня исследователя. Пик откладки яиц обычно приходится на ранние вечерние часы, хотя возможны вариации — это зависит от конкретной линии. Здесь может помочь инкубатор с обращенным суточным циклом. Следует, однако, учесть, что мухи должны содержаться в таком инкубаторе на протяжении всей их жизни, так как биоритмы закладываются на стадии личинки и сохраняются во взрослом состоянии.

Для сбора яиц подложите мухам свежую чашку с небольшим мазком дрожжей и содержите их в темном спокойном месте при комнатной температуре. Процедура трансформации предусматривает инъекцию ДНК в эмбрион на ранних этапах дробления (0—2 ч при 25 °C) до того момента, когда вокруг разделившихся ядер начинают формироваться клетки. Обычно однократный сбор яиц обеспечивает вполне приемлемую степень синхронности. Однако первый дневной сбор в работу брать нельзя, так как самки могут задерживать откладку оплодотворенных яиц на несколько часов, вследствие чего к моменту сбора эти яйца оказываются уже на неподходящей для планируемого эксперимента стадии развития. Между прочим отметим, что один час — это приблизительно то время, которое требуется одному работнику, чтобы дехорионизировать, разложить, высушить и «уколоть» 50—75 эмбрионов — еще и останется несколько минут, чтобы передохнуть. В ряде случаев мух, не отложивших яйца, можно стимулировать к кладке, если содержать их в условиях дрожжевого голодания (подложив им чашку только с агаризованным виноградным соком), а затем, через несколько часов, перевести на обычный корм.

4.3. Дехорионизация эмбрионов

Перед тем как игла проникнет в оплодотворенное яйцо и введет внутрь порцию ДНК, его прочная хорионическая мембрана («скорлупа») должна быть удалена; такой эмбрион защищен от внешнего мира только внешней вителлиновой мембраной. Существуют два способа дехорионизации: механический и химический. Целесообразно, если это возможно, проводить дехорионизацию и все последующие процедуры при 18 °C, чтобы замедлить развитие эмбрионов.

4.3.1. Механическая дехорионизация

Свежеотложенные яйца обрабатывают, осторожно накатывая их на липкую поверхность. Это делают под микроскопом (10—15×увеличение) следующим образом. Готовят рабочую поверхность из двух предметных стекол, соединяя их встык с помощью липкой ленты. На одно стекло наклеивают полоску двусторонней липкой целлофановой ленты. На другое стекло прикрепляют липкой лентой или же каплей воды покровное стекло, в центре которого наклеивают очень узкую (1—2 мм) полоску двусторонней ленты. Эту задачу можно облегчить, если наклеить сначала более широкую полоску ленты, а затем удалить лишнее скальпелем или лезвием бритвы.

Соберите яйца с поддона либо под микроскопом с помощью часового пинцета, либо увлажненной мягкой кисточкой и пере-

несите их на широкую полоску липкой ленты. Под микроскопом скатайте пинцетом маленький шарик клея, соскоблив его с липкой ленты, и крепко держите: этот клеевой шарик защитит яйцо от твердого металла пинцета и поможет захватить дехорионизированное яйцо. Осторожно раскатайте яйца по поверхности липкой ленты; каждое яйцо катайте до тех пор, пока хорион не отделится и не обнажится вителлиновая мембрана. После этого яйцо закатывают с липкой поверхности обратно на участок приклеившейся хорионической мембраны, с которой его можно легко захватить с помощью клеевого шарика. Дехорионизированные яйца переносят на узкую полоску липкой ленты, наклеенную на покровное стекло, и проводят микроинъекции, как это описано ниже, в разд. 4.3.3.

По мере приобретения необходимых практических навыков процедура дехорионизации уже не кажется очень сложной, а потери биоматериала сводятся к минимуму.

4.3.2. Химическая дехорионизация

Хлорная известь (гипохлорит натрия) быстро разрушает хорион яйца, не повреждая при этом развивающийся зародыш (однако на жизнеспособность эмбриона может повлиять качество конкретной партии извести). Используйте 50%-ный раствор хлорной извести и слегка охлажденную (до 18 °C) воду. Осторожно перенесите собранные яйца с помощью увлажненной мягкой кисточки или просто смыв их струей воды на фильтровальную воронку типа Millipore диаметром 1 см с фильтром Whatman CF-C и промойте их при небольшом отрицательном давлении. При переносе постарайтесь захватить как можно меньше дрожжевой массы, так как она может забить фильтр. Выключите вакуумный насос, налейте в воронку раствор извести и оставьте на 1—2 мин. Включите вакуумный насос и аккуратно удалите раствор. Промойте дехорионизированные яйца два-три раза дистиллированной водой.

Переложите фильтр на столик микроскопа. Обычно яйца собираются в центре фильтра. Влажной кисточкой перенесите их с фильтра на чистое предметное стекло, а затем с помощью тонкой иглы или пинцетом по одному — на полоску липкой ленты, наклеенную на покровное стекло. Маленький клеевой шарик, удерживаемый пинцетом, облегчит задачу.

4.3.3. Раскладывание эмбрионов

Дехорионизированные яйца следует располагать так, чтобы их задние концы выступали за пределы узкой полоски двусторонней липкой ленты, наклеенной на покровное стекло (выступающее микропиле на переднем конце яйца служит хорошим

указателем для его ориентации). В свою очередь покрывное стекло можно закрепить на предметном стекле либо с помощью капли воды, либо липкой лентой.

Раскладывая эмбрионы, целесообразно располагать их группами по пять. Это облегчает подсчет и позволяет без труда идентифицировать нужное яйцо, если, например, возникла необходимость удалить «неуколотый» эмбрион. На одном стекле можно разложить от 50 до 75 яиц — на это уходит 15–20 мин. Может быть, на первый раз легче приготовить два или три отдельных стекла — по 25 яиц на каждом — и высушивать их по очереди.

Замечено, что разные марки целлофановой ленты и даже разные партии ленты одного и того же типа по-разному влияют на жизнеспособность дехорионизированных эмбрионов. Поэтому имеет смысл проверить имеющиеся в распоряжении типы ленты: прикрепить яйца, покрыть их маслом и подсчитать потом число эмбрионов, развившихся до стадии личинки.

4.4. Высушивание

Весьма важно, чтобы эмбрионы были подсушены перед тем, как в них будет введен довольно значительный объем раствора ДНК. Этот этап является критическим при подготовке эксперимента, но, к сожалению, он с трудом поддается количественному учету: оптимальная степень высушивания варьирует в зависимости от конкретных экспериментальных условий. Пересушивание резко снижает жизнеспособность дехорионизированных эмбрионов даже без инъекции. Если же яйца недостаточно подсушены, их содержимое начинает выделяться наружу при прокалывании иглой вителлиновой мембраны. Оптимальную степень высушивания определяют эмпирически.

Поместите покрывное стекло с эмбрионами в чашку Петри на слой осушителя — Drierite (CaCl_2) или силикагеля — и закройте чашку. В принципе оптимальным следует считать минимальное высушивание, необходимое для того, чтобы полностью сохранить содержимое яйца при инъекции в него раствора ДНК. Время оптимального высушивания зависит от влажности воздуха в комнате, количества связанной воды в составе осушителя, продолжительности процедуры раскладывания эмбрионов на липкой ленте и т. д. Обычно сушка занимает от 5 до 15 мин. После высушивания немедленно покройте эмбрионы каплей масла Halocarbon — она будет их единственной защитой от внешней среды до того момента, когда выведутся личинки. Масло выпускается различной вязкости. Маловязкое масло счет и не сможет предохранить яйца от высыхания. Слишком вязкое масло затрудняет оперирование иглой. Оптимальной можно считать вязкость масла серии 700 (Halocarbon products).

Масло Voltalef Grade 10S чуть менее вязкое, но вполне пригодное, предпочтительнее было бы Grade 20S, но его трудно приобрести.

4.5. Изготовление и подготовка иглы

Игла должна быть как можно более тонкой, чтобы повреждение эмбриона было минимальным, но в то же время ее просвет должен быть достаточным, чтобы можно было без труда вводить внутрь эмбриона раствор ДНК.

Микрокапилляр вытягивают на специальном электрическом приборе в тонкую иглу (<1 микрона), которая у основания имеет вид тупого конуса, а дальше по направлению к острию приобретает остроконечную форму; ее длина от начала конусной части до острия составляет примерно 0,5 см. Слишком тонкая в дистальной части игла будет изгибаться в вязком масле при малейшем перемещении столика микроскопа, и придется ждать, когда она прекратит колебаться, чтобы продолжить работу. Если же игла в дистальной части будет иметь слишком выраженную коническую форму, она проделает в эмбрионе очень большое отверстие. Из микрокапилляров фирмы Dgimmond получают неплохие иглы для микроинъекций, однако для изготовления «идеальных» игл нужны микрокапилляры с тонким стеклянным рубчиком (филаментом) на внутренней поверхности: такая конструкция сильно облегчает процедуру заполнения иглы, так как капля раствора ДНК, помещенная в верхней, широкой части иглы, сама перемещается в ее нижнюю часть за счет капиллярных сил, возникающих на поверхности рубчика.

Силиконировать микрокапилляры не обязательно, необходимо лишь, чтобы они были чистыми изнутри, так как даже мельчайшая пылинка может закупорить просвет иглы. Поэтому следует промыть микрокапилляры фильтрованным абсолютным этанолом.

Закрепите иглу в микроманипуляторе и осмотрите ее конусную часть и запаянный кончик под микроскопом. Удалить запаянный конец (заострить иглу) можно путем легкого постукивания или притирания ее кончика о край покрывного стекла, прикрепленного к предметному стеклу. Сперва сфокусируйте микроскоп на стекле, а затем с помощью микроманипулятора предметного столика попробуйте несколько раз провести краем стекла по кончику иглы. В идеале отверстие иглы должно иметь в диаметре приблизительно 1 мкм и быть слегка скошенным. Конечно, описанная процедура в известной степени рассчитана на удачу, однако практика показывает, что получить желаемый результат все-таки можно. Выньте иглу из ап-

парата — она готова для заполнения. Можно сделать и по-другому: сначала заполнить иглу раствором ДНК, а уже затем заниматься удалением запаянного конца.

4.6. Приготовление ДНК для инъекции

Суперспирализованные плазмиды, несущие в своем составе транспозоны и хелперные Р-элементы, должны присутствовать в растворах, свободных от потенциально вредных химических агентов, таких, как CsCl, трис и ЭДТА. Предназначенную для инъекции ДНК осадите спиртом, осадок соберите центрифугированием и осторожно промойте сначала 70%-ным этанолом в присутствии 0,2 М NaCl и затем водным 70%-ным этанолом. Растворите осадок ДНК в буфере для инъекции (5 мМ KCl; 0,1 мМ фосфат натрия pH 6,8) до конечной концентрации 1 мг/мл. Чистые препараты ДНК весьма стабильны в этом буфере и без заметного вреда переносят даже повторные циклы замораживания — оттаивания.

Смешайте растворы плазмид, содержащих транспозоны и хелперные элементы в необходимой пропорции, и доведите суммарную концентрацию ДНК в растворе до требуемой величины. Как уже упоминалось ранее, оптимальное соотношение плазмид точно неизвестно. Изначально было предложено соотношение 5:1, чтобы уменьшить вероятность транспозиции хелперного элемента. Очевидно, однако, что в случае использования хелперной плазмиды рл25.7ws это соображение можно не принимать в расчет. Концентрация хелперной ДНК не должна превышать 500 мкг/мл, так как более высокая концентрация не увеличивает эффективность трансформации и даже может оказывать противоположное действие [2], вероятно, за счет локального создания в эмбрионе клеточной среды Р-цитотипа (блокирующего транспозицию Р-элементов). В то же время нет видимых причин ограничивать количество рекомбинантной ДНК на основе Р-вектора. Смесь, содержащая по 250 мкг/мл вектора и хелперной плазмиды рл25.7ws, позволила добиться 30%-ной трансформации [5]. Соотношение в смеси векторной плазмиды и хелперной плазмиды 10:1 (суммарная концентрация ДНК 5 мкг/мл) также дало хорошие результаты — в одном эксперименте эффективность трансформации достигла 50% [26]. Молярное соотношение 20:1 при общей концентрации ДНК 1 мг/мл позволило получить около 30% трансформантов [11]. Понятно, что отмеченная разница в эффективности трансформации не имеет решающего значения (см. также разд. 8.1).

Центрифугируйте раствор ДНК в буфере для инъекции не продолжительное время в микроцентрифуге, чтобы удалить любые частицы, способные закупорить просвет иглы. Отберите из

поверхностного слоя 2 мкл раствора и введите этот объем в иглу, либо используя капиллярный эффект, либо непосредственно — с помощью оттянутого микрокапилляра или микрошприца типа Hamilton. Заполненную иглу надо немедленно закрепить в микроманипуляторе и ее острие осторожно опустить в каплю масла Halocarbon, которую предварительно наносят на предметное стекло, закрепленное на столике микроскопа. Это предохранит раствор ДНК от выпаривания — в противном случае могут образоваться кристаллы соли, которые закроют просвет иглы. Если игла не сломалась и не закупорилась, ею можно пользоваться в течение нескольких дней.

5. Инъекция ДНК в эмбрионы

5.1. Подходящая для инъекции стадия эмбрионального развития

Эмбриональное развитие дрозофилы подразделяется на ряд морфологически различающихся стадий. Всестороннее описание этих стадий и превосходные микрофотографии можно найти в [27]. Ранний эмбрион представляет собой синцитий с делящимися ядрами. Примерно через два часа после оплодотворения (при 25°C) начинается формирование отдельных одноядерных клеток. Первыми оформляются полярные клетки на заднем конце эмбриона, которые в будущем дадут начало яйцеклеткам и сперматозоидам взрослых особей. Приблизительно через 1 ч после оплодотворения, незадолго до начала формирования полярных клеток, желток отделяется от вителлиновой мембраны на заднем конце эмбриона, оставляя прозрачную, наполненную жидкостью полость — так освобождается жизненное пространство для развивающихся полярных клеток. Эту стадию легко идентифицировать, и эмбрионы, достигшие именно этой стадии развития (или более ранние), — идеальный объект для микроинъекции (рис. 2).

5.2. Микроинъекция

Для успешной трансформации необходимо, чтобы Р-элемент попал в зародышевую ткань эмбриона. Это достигается за счет инъектирования плазмидной ДНК в заднюю часть эмбриона, завершающего стадию синцития, непосредственно перед началом формирования полярных клеток. Чтобы замедлить процесс развития эмбриона, инъекции проводят при 18°C в прохладной комнате или на охлаждаемом предметном столике микроскопа (впрочем, это условие не является абсолютно необходимым).

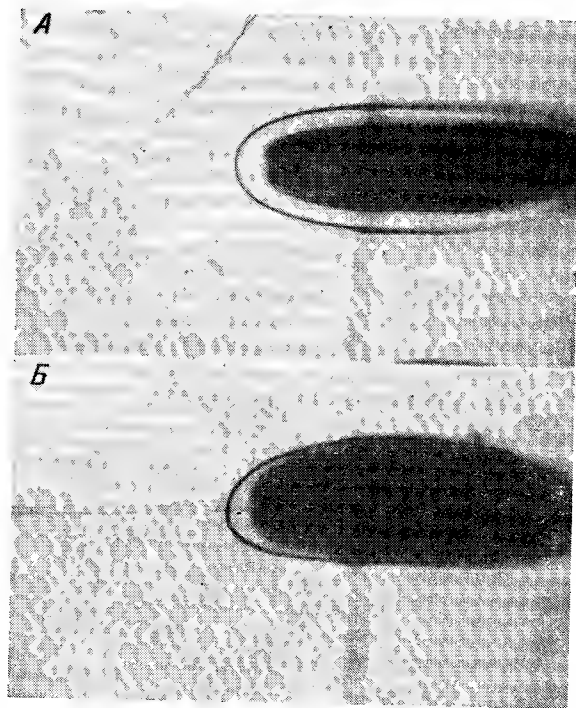


Рис. 2. Микрофотография развивающегося эмбриона дрозофилы. А. Эмбрион на стадии, предшествующей бластуляции (приблизительно 1 ч после оплодотворения) в момент инъекции. Обратите внимание на свободное пространство у заднего конца — оно предназначено для развивающихся полярных клеток. Б. Эмбрион на стадии бластодермы. На этой стадии инъецировать ДНК уже поздно: полость у заднего конца эмбриона заполнена округлыми полярными клетками.

Покровное стекло с эмбрионами прикрепите к предметному стеклу с помощью липкой ленты или просто капель воды и поместите стекла на столик микроскопа так, чтобы задние концы эмбрионов были направлены в сторону иглы. Расположите эмбрионы так, чтобы их концы были в центре поля зрения. Теперь, используя микроманипулятор, вводите в поле зрения иглу; ее направление должно совпадать с продольной осью эмбриона, но держать ее надо чуть выше фокальной плоскости эмбриона. Сфокусируйте микроскоп на средней плоскости эмбриона (так, чтобы контур его задней части выглядел максимально четким). С помощью микроманипулятора медленно вводите иглу в фокус микроскопа — при этом игла расположится в средней плоскости эмбриона. Это как раз и есть тот уровень, на котором следует производить укол. Окончательно скоррек-

тировать положение иглы можно путем легкого пробного «покалывания» эмбриона (с помощью манипулятора предметного столика); затем эмбрион осматривают и оценивают расположение вмятинок, оставляемых иглой на его поверхности.

Пользуясь микроманипулятором или манипулятором предметного столика, проколите иглой вителлиновую мембрану эмбриона. Тем, кто не склонен к тонким осторожным движениям и медленной кропотливой работе, возможно, покажется, что двигать иглу к эмбриону не такое нудное дело, как перемещать эмбрион по направлению к игле, однако манипулирование предметным столиком обеспечивает большую точность движений. Таким образом, яйцо как бы накаливается на иглу. Когда прокол произведен, иглу выводят несколько назад, так чтобы ее конец оказался непосредственно за границей желтка: ДНК лучше вводить не в наполненную жидкостью полость, где будут развиваться полярные клетки, а в ту область желтка, где на стадии синцития локализуются ядра будущих полярных клеток. Тонкая острая игла наносит эмбриону минимальные повреждения, потому что для прокалывания вителлиновой мембраны она требует меньшего усилия и, следовательно, проникает на меньшую глубину, чем более толстая или более тупая игла. К тому же она оставляет после себя относительно небольшое отверстие на поверхности эмбриона. Старайтесь не сильно тревожить желток: толстая игла или неосторожные движения могут нарушить систему позиционного контроля в яйце, которая обеспечивает правильное эмбриональное развитие.

Иглу соединяют пластиковой трубкой с наполненным воздухом шприцем разового пользования на 25 мл. Перемещая поршень шприца, осторожно выдувают видимый объем раствора ДНК, который составляет 1—5% от объема яйца. При этом можно наблюдать, как раствор ДНК перетекает в желток. Если инъецируемый объем слишком велик, содержимое эмбриона начнет вытекать наружу после того, как игла будет удалена. Это может также служить указанием на то, что эмбрион был недостаточно высушен. Не падайте духом, если небольшое количество желтка все-таки вытекло после инъекции. Очень часто такие эмбрионы успешно развиваются в здоровых мух.

Как правило, несколько эмбрионов из тех, что закреплены на покровном стекле, к моменту инъекции дойдут в своем развитии до стадии образования бластодермы или даже до более поздних стадий. Не нужно колоть эти эмбрионы: вероятность их трансформации мала, а шансы выжить велики. Работа же по содержанию мух и их потомства для поиска трансформантов существенно превышает по объему затраты труда на элиминацию этих неперспективных эмбрионов. По ходу инъецирования всей серии яиц отмечайте позиции неуколотых эмбрионов («переразвитых» или поврежденных). Закончив эту процедуру, пе-

перенесите покровное стекло с эмбрионами под микроскоп и удалите неуколотых эмбрионов с помощью пинцета или тонкой иглы, отметив количество оставшихся хороших яиц.

5.3. Инкубация эмбрионов после инъекции

Поместите покровное стекло с эмбрионами во влажную камеру при 18—20 °C и инкубируйте до момента выхода личинок. Практически это можно осуществить, взяв обычную чашку Петри с прикрепленной к крышке изнутри влажной фильтровальной бумагой и поместив туда стекло с эмбрионами, покрытыми маслом. Важно, чтобы чашка стояла горизонтально, иначе масло стечет и эмбрионы погибнут. Когда выведутся личинки (приблизительно через 2 дня) перенесите их пинцетом на стандартную среду для мух — примерно по десять личинок на флакон — и инкубируйте при 25 °C. Без заметного вреда для себя личинки могут провести в масле несколько часов. Можно сделать и по-другому: оконтурить алмазным резцом участок покровного стекла с закрепленными эмбрионами и, обломав лишнее, поместить этот кусочек стекла в узкий желобок, выдавленный в слое корма в чашке Петри. Затем необходимо заполнить желобок маслом, чтобы предохранить эмбрионы от случайного высыхания на воздухе. Когда личинки выведутся, они легко внедрятся в слой корма. Следует, однако, попытаться собрать эти личинки, чтобы определить их число и затем перенести в более подходящий флакон со средой для мух.

6. Поиск трансформантов

Каждую взрослую муху, развивавшуюся из «уколотого» эмбриона (поколение G_0), надо индивидуально скрестить с мухами хозяйской линии. Важно получить как можно более многочисленное потомство G_1 , поскольку трансформанты могут попадаться не чаще, чем 1 на 200 мух. Скрещивайте каждую G_0 -самку с несколькими самцами и отсаживайте родителей в новые пробирки каждые 5 дней. G_0 -самцов скрещивайте с несколькими разными группами самок по 3—4 особи в каждой. Их также следует отсаживать каждые несколько дней. Таким образом от одной самки можно получить до 150 потомков и от одного самца — до 300.

Далее исследуют фенотип G_1 -потомков. Если в качестве селективного маркера использовался ген *Adh*, трансформантов можно отбирать по устойчивости к 6%-ному раствору этанола [9]. Для выявления маркера *neo^R* потомство G_1 на личиночной стадии содержат на среде, в которой присутствует препарат G418 в концентрации 1 мг/мл. Подобная селекция трансформантов по лекарственной устойчивости значительно экономит

время. При использовании в качестве маркера гена *rosy* мух просматривают, для того чтобы отобрать особей с фенотипом *ry⁺*. Хотя поначалу различия в цвете глаз у мух с фенотипом *ry* и *ry⁺* могут показаться неочевидными, очень скоро у исследователя вырабатываются необходимые навыки и он без труда замечает даже самые малые изменения в фенотипическом выражении этого признака.

Известно, что истинные трансформанты могут обнаруживать промежуточный фенотип между *ry* и *ry⁺*, что объясняется интеграцией P[ry] в транскрипционно-неактивные или гетерохроматиновые области хромосомы [5, 22]. Безусловно, эти трансформанты представляют собой научный интерес, однако при селекции по маркерам *Adh* или *neo^R* они, естественно, будут утрачены. Спрадлинг и Рубин [22] показали, что лишь очень немногие (если это вообще возможно) P[ry]-элементы встраиваются в такие участки генома, где уровень экспрессии гена *ry* столь низок, что не обеспечивает трансформантам фенотипического отличия.

Доля трансформантов в G_1 -потомстве одного G_0 -родителя может сильно варьировать. Часто удается обнаружить только одного или двух трансформантов, однако бывают и более удачные эксперименты. В редких случаях трансформанты могут составлять значительную часть всего потомства — до 50% и даже более. Можно предположить, что это результат множественной транспозиции разных P-элементов в клетки зародышевого пути «уколотой» (G_0) мухи, причем в разные хромосомные локусы [8]. Однако чаще все же приходится сталкиваться с единичными актами интеграции. Поскольку транспозиция, как правило, происходит премейотически, несколько трансформированных потомков одного G_0 -родителя с высокой степенью вероятности могут обнаруживать идентичные сайты интеграции P-элемента.

Довольно часто мухи поколения G_0 , подвергнутые инъекции P[ry]-ДНК, имеют фенотип, промежуточный между *ry* и *ry⁺*. Подобная « G_0 -экспрессия» *ry* может служить указанием на то, что ДНК была успешно введена в эмбрион и ее экспрессия осуществляется надлежащим образом. Однако достоверной корреляции между G_0 -экспрессией *ry* и трансформацией зародышевого пути не наблюдается [1, 16].

7. Характеристика трансформантов

Первоочередной задачей теперь является получение линий G_1 -трансформантов. Трансформированное потомство данной G_0 -мухи можно скрещивать между собой или с мухами хозяйской линии, чтобы вывести трансформированную родительскую линию. Как мы уже говорили, в том случае, если значительная часть потомства имеет трансформированный фенотип, велика

вероятность того, что в геноме присутствует больше чем один Р-транспозон. Если разные сайты интеграции находятся на разных хромосомах, их будет нетрудно изолировать потом (когда не будет опасности потерять линию) путем скрещивания представителей родительской линии с мухами, несущими доминантно-маркированные хромосомы-балансёры. Чаще, однако, в геноме присутствует единственная вставка.

Заканчивая этот раздел, нелишне напомнить, что получение трансформантов занимает значительно меньше времени, чем характеристика и детальное изучение их биологических свойств.

7.1. Генетический анализ

Вернемся к случаю множественной интеграции Р-элементов и вытекающей отсюда задаче получения линий трансформантов с единственной вставкой. Стандартные генетические скрещивания с использованием доминантно маркированных хромосом-балансёров позволяют идентифицировать и разделить разные хромосомы, несущие интегрированные Р-элементы. Хромосомы-балансёры содержат множественные инверсии, которые супрессируют их рекомбинацию с соответствующими хромосомными гомологами. Вдобавок они содержат один или несколько доминантных генетических маркеров, по которым можно отличить мух, несущих балансёры, от особей, гомозиготных по соответствующим гомологам. Примерами широко используемых балансёров могут служить: для X-хромосомы — *FM7, B* (маркированный геном *Bar*); для второй хромосомы — *CyO* (маркированный мутацией *curly* — загнутые крылья) и для третьей хромосомы — *TM3, Sb ser* (маркированный мутациями «короткие щетинки» и «зазубренные крылья»).

Исследователь должен располагать линиями со сцепленными X-хромосомами и набором балансёрных линий для трех главных хромосом. (Хотя это условие и не является абсолютно необходимым, оно существенно облегчает дальнейший генетический анализ трансформантов.) Например, если Р-элемент маркирован геном *rosy* дикого типа, пригодятся линии *C(1)DX, yf; ry⁴²*, линии *FM7; ry⁴²*, линии *CyO; ry⁴²* и линии *TM3, ry/ry⁴²*. Отметим, что, поскольку ген *ry* дикого типа локализуется в хромосоме 3, понадобится балансёр третьей хромосомы, который несет мутантный ген *ry*. Аналогично, если в качестве маркера транспозона используется ген *Adh*, понадобится соответствующий балансёр второй хромосомы, например *CyO*.

Чтобы повысить шансы на сохранение каждого Р-транспозона в популяции, несколько особей родительской линии следует скрестить по отдельности с представителями каждой из балансёрных линий. Полученное потомство, несущее в геноме маркер транспозона, и тот или иной доминантный маркер балансёра, скрещивают затем с мухами хозяйской линии. Сегрегация

Таблица 1. Основные этапы получения и характеристики трансформированных линий

Этапы	Пример
Этап 1 Поколение G ₀ В эмбрионы хозяйской линии инъецируют смесь хелперных Р-элементов и Р-транспозонов, несущих селективный маркер	Смесь Р[<i>ry</i>] и рл25.7wс инъецируют в 100 G ₀ <i>ry⁴²</i> -эмбрионов
Этап 2 Поколение G ₀ Выживших и достигших взрослого состояния мух индивидуально скрещивают с представителями хозяйской линии, чтобы получить максимальное количество потомков	Получено 20 взрослых особей; их индивидуально скрещивают с <i>ry⁴²</i> -партнерами. 10 особей оказались фертильными и дали по несколько сотен потомков
Этап 3 Поколение G ₁ Потомков каждого G ₀ -родителя анализируют (или проводят скрининг) на наличие трансформированного фенотипа. Трансформированных потомков каждого G ₀ -родителя скрещивают друг с другом или с представителями хозяйской линии, чтобы получить трансформированные родительские линии	В потомстве двух из 10 G ₀ -родителей обнаружены мухи <i>ry⁺</i> . В одном случае это три самца <i>ry⁺</i> и две самки <i>ry⁺</i> ; их скрещивают между собой и получают родительскую линию А. В другом случае это единственный самец <i>ry⁺</i> , которого скрещивают с самками <i>ry⁴²</i> , — получают родительскую линию В
Этап 4 Поколение G ₂ и далее Родительские линии изучают путем блот-гибридизационного анализа ДНК, чтобы определить количество Р-транспозонов, присутствующих в геномах представителей каждой линии	Гибридизационные эксперименты показали, что в геномах мух каждой из родительских линий присутствует единственный Р-транспозон
Этап 5 Параллельно с этапом 4 представителей каждой родительской линии скрещивают с различными балансёрными линиями, чтобы определить, в какой хромосоме локализуется внедрившийся в геном Р-транспозон	Мух из родительской линии А скрещивают с мухами <i>CyO; ry⁴²</i> и <i>TM3, ry/ry⁴²</i> . В следующем поколении мух <i>ry⁺ CyO</i> или <i>TM3</i> индивидуально скрещивают снова с мухами <i>ry⁴²</i> . При этом все потомство <i>CyO</i> оказывается <i>ry⁻</i> , тогда как потомство <i>TM3</i> оказывается наполовину <i>ry⁺</i> и наполовину <i>ry⁻</i> . Следовательно, инверсия Р[<i>ry</i>] наследуется независимо от <i>CyO</i> , т. е. она расположена не во второй хромосоме. Родительскую линию В скрещивают с мухами <i>CyO; ry⁴²</i> и <i>TM3, ry/ry⁴²</i> . В следующем поколении мух <i>ry⁺ CyO</i> и <i>ry⁺ TM3</i> индивидуально скрещивают с мухами <i>ry⁴²</i> . В потомстве, полученном от этих скрещиваний, фенотипы <i>ry⁺</i> и <i>ry⁻</i> встречаются с равной частотой как среди <i>TM3</i> -мух, так и среди <i>CyO</i> -мух; это свидетельствует о том,

Продолжение

что элемент не связан ни с одной из аутосом. Затем одиночных ry^+ -самцов скрещивают с самками ry^{42} , несущими сцепленные X-хромосомы. В следующем поколении обнаруживается, что все самцы — ry^+ , а все самки — ry^- , что указывает на ассоциацию $P[ry]$ -элемента с X-хромосомой

Этап 6

Итак, получены линии мух, содержащих в геноме одиночные вставки, и проведена их первичная характеристика. Хромосому, несущую Р-элемент, можно получить в гомозиготном состоянии, или же, если вставка обуславливает летальную мутацию, ее можно поддерживать с помощью балансёра. Структурную целостность Р-транспозона можно проверить с помощью блот-гибридизации ДНК, а локализацию транспозона на хромосоме — путем гибридизации *in situ*

Этап 7

Можно приступать к запланированным экспериментам

трансформационного маркера и доминантного маркера балансёра позволит определить хромосому, несущую в своем составе интегрированный транспозон. Например, мы имеем родительскую линию с $P[ry]$ -транспозоном, интегрированным во вторую хромосому. После описанных скрещиваний появятся три группы потомков со следующими генотипами: $FM7, B/+; P[ry]/+; ry/ry$ (полосковидные глаза и ry^+), $+/+; CyO/P[ry]; ry/ry$ (загнутые крылья и ry^+) и $+/+; P[ry]/+; TM3, Sb Ser ry/ry$ (короткие щетинки, зазубренные крылья и ry^+). При скрещивании представителей каждой из этих групп с хозяйской ry -линией появятся как ry^+ , так и ry^- -мухи с полосковидными глазами или зазубренными крыльями, однако только ry^- -мухи с загнутыми крыльями и только ry^+ -мухи с нормальными крыльями (табл. 1). Отсюда можно заключить, что $P[ry]$ -транспозоны присутствуют во второй хромосоме. Если в геноме данной особи два $P[ry]$ -элемента локализуются в разных хромосомах, их можно разделить с помощью дальнейших скрещиваний с балансёрными линиями.

Представителей родительской линии А снова скрещивают с мухами $CyO; ry^{42}$, отбирают ry^+ CyO -братьев и сестер (генотип $P[ry]/CyO$) и скрещивают между собой. В следующем поколении отбирают мух, не имеющих CyO , и используют их для получения гомозиготной линии $P[ry]/P[ry]$. Вставку $P[ry]$ родительской линии В поддерживают в патроклинной линии со сдвоенными Х. Одиночных самцов этой линии скрещивают с самками, имеющими балансёр Х-хромосомы $FM7$. В следующем поколении $FM7/P[ry]$ — самок скрещивают с самцами патроклинной линии. Потомков, не имеющих $FM7$ (братьев и сестер), используют для получения гомозиготной линии

7.2. Блот-анализ ДНК

Параллельно с генетическими исследованиями приступают к изучению структуры интегрированных Р-элементов с помощью блот-гибридизационного анализа ДНК [28]. Геномную ДНК расщепляют рестрикционной эндонуклеазой, которая имеет единственный сайт узнавания внутри рекомбинантной конструкции на основе Р-элемента, содержащей интересующий ген, и полученный гидролизат фракционируют методом гель-электрофореза. Затем ДНК переносят на нитроцеллюлозный фильтр и гибридизуют с радиоактивной пробой, которая гомологична только одному из двух фрагментов ДНК, несущих концы рекомбинантной конструкции. Число гибридизующихся фрагментов соответствует количеству Р-транспозонов в популяции, а размер каждого фрагмента может служить характеристикой соответствующего сайта интеграции. Однако надо отдавать себе отчет в том, что этот подход позволяет лишь охарактеризовать в целом популяцию рекомбинантных транспозонов в данной популяции мух родительской линии. Индивидуальные же особи могут нести только один элемент из тех, что присутствуют в популяции.

С помощью подходящих рестриктаз можно также удостовериться в интактности интегрированного Р-элемента, чтобы не упустить из поля зрения его возможную структурную реорганизацию. Структурные перестройки Р-транспозонов — события вполне реальные, хотя и не очень частые.

7.3. Гибридизация *in situ*

Гибридизация радиоактивно меченных проб, содержащих Р-элементы с политемными хромосомами трансформированных линий, позволяет получить наиболее детальную информацию о сайтах интеграции этих элементов. Коротко метод заключается в следующем. Слюнные железы личинок трансформированных мух раздавливают на предметном стекле; политемные хромосомы при этом высвобождаются и расправляются. ДНК в составе хромосом частично денатурируют и гибридизуют с радиоактивно меченной или биотинированной ДНК-пробой, гомологичной интегрированному Р-транспозону. Затем с помощью радиоавтографии или иммунохимическими методами определяют расположение сайтов интеграции (полное описание экспериментальной процедуры можно найти в работах [29, 30]).

Не стоит, однако, стремиться получить эту информацию в первую очередь. На наш взгляд, целесообразнее вначале выделить линию с единичной вставкой и провести детальный блот-гибридизационный и сегрегационный анализ.

8. Факторы, влияющие на успех эксперимента

8.1. Эффективность трансформации

Согласно опубликованным данным, в популяции переживших инъекцию взрослых фертильных особей (G_0) доля трансформантов варьирует от 1—2% до 50% [1, 3, 7, 9, 10, 16, 22]; в среднем эта величина составляет около 10%. Обсуждается целый ряд условий, так или иначе влияющих на частоту трансформации, однако систематический анализ соответствующих параметров в большинстве случаев не проводился. Перечислим некоторые из них.

1. Количество вводимой ДНК. Слишком большое количество хелперных Р-элементов, по-видимому, ингибирует трансформацию [2].

2. Количественное соотношение дефектных рекомбинантов и хелперных элементов (см. разд. 4.6).

3. Размер рекомбинантной конструкции на основе Р-транспозона.

4. Характер нуклеотидных последовательностей, присутствующих в данной конструкции. Имеются указания на то, что крупные Р-элементы транспозируются с более низкой частотой. Однако это нельзя считать общим правилом, поскольку известно много примеров, когда транспозоны сходного размера трансформируют объект с разной эффективностью. Теоретически ограничений на размер Р-транспозона не существует. На практике наиболее крупный из известных на сегодняшний день вариант Р-элемента, который был успешно использован в экспериментах по трансформации, имел размер 54 т. п. н. [16].

Успех эксперимента во многом зависит и от таких факторов, которые трудно учесть количественно. К их числу относится уровень индивидуальной подготовки экспериментатора, в частности, в какой степени он владеет необходимыми техническими навыками. Несмотря на то что в ранних работах [1, 16] часто фигурировала цифра 50% трансформантов (среди выживших взрослых особей), в последующих экспериментах далеко не всегда удавалось достичь столь высоких результатов.

8.2. Частота выживания

Обычно лишь около 15% «уколотых» эмбрионов выживает и достигает стадии половозрелой особи. Потери возможны на любом этапе развития. Так, например, по сообщениям Хейзелригга [3], из 3500 эмбрионов, подвергнутых инъекции, 40% превратилось в личинки, из них 50% достигло взрослого состояния и из этих последних 65% оказались плодовитыми. Вероятно, наиболее важными факторами, понижающими жизне-

способность и плодовитость мух, переживших инъекцию, являются подсушивание эмбриона и повреждение эмбриона иглой. У начинающих экспериментаторов наибольшее число неудач падает на эмбриональную стадию, однако положение дел быстро улучшается по мере приобретения необходимого опыта.

9. Ремобилизация Р-транспозона у трансформированных мух

Если интегрированный Р-транспозон присутствует в интактной форме, он может быть снова мобилизован при условии возникновения молекулярной среды, характерной для дисгенных гибридов. Это достигается, как было описано выше, путем инъекции интактного хелперного Р-элемента (например, рл25.7wc) в развивающийся зародыш; особенность здесь состоит в том, что сама хозяйская линия представляет трансформированную линию, содержащую дефектный рекомбинантный Р-элемент. Хелперный элемент обеспечивает синтез транспозазы, которая и ремобилизует интегрированный транспозон.

Хейзелригг и Левис [31] инъецировали wc-хелпер в концентрации 50—100 мкг/мл трансформированным мухам, содержащим в геноме Р[white]-транспозон. В результате от 20 до 40% мух G_0 дали по меньшей мере по одному потомку, обнаруживающему новый сайт интеграции Р-транспозона. Таким образом, частота ретранспозиции оказалась выше, чем средняя частота изначальной трансформации.

Техника ремобилизации Р-транспозона может оказаться полезной, например, в том случае, если необходимо переместить уже присутствующий в геноме рекомбинантный Р-элемент с интересующим геном на конкретную хромосому. Эта методика пригодится и тогда, когда случайно обнаружен трансформант, фенотип которого по тем или иным признакам можно объяснить эффектом положения. Проверить такое предположение можно непосредственно: надо транспозировать Р-транспозон в другой участок генома и наблюдать за изменениями в экспрессии мобилизованного гена, которые будут сопровождать это перемещение.

Литература

1. Rubin G. M., Spradling A. C. *Science*, **218**, 348 (1982).
2. Spradling A. C., Rubin G. M. *Science*, **218**, 341 (1982).
3. Hazelrigg T., Levis R. L., Rubin G. M. *Cell*, **36**, 469 (1983).
4. Fyrberg E. A., personal communication.
5. Davies J., Delaney S., Glover D. M., personal communication.
6. Wensink P., personal communication.
7. Scholnick S. B., Morgan B. A., Hirsh J. *Cell*, **34**, 37 (1983).
8. Wakimoto B., Kalfayan L., Spradling A., personal communication.
9. Goldberg D., Posakony J., Maniatis T. *Cell*, **35**, 59 (1983).

10. Lis J. T., Simon J. A., Sutton C. A. Cell, **35**, 403 (1983).
11. Steller H., Pirrotta V. EMBO J., **4**, 163 (1985).
12. Engels W. R. Annu. Rev. Genet., **17**, 315 (1983).
13. Bregliano J. C., Kidwell M. G. In: Mobile Genetic Elements, Shapiro J. A. (ed.), Academic Press, New York, pp. 363, 1983.
14. O'Hare K., Rubin G. M. Cell, **34**, 25 (1983).
15. Karess, Rubin G. M. Cell, **38**, 135 (1984).
16. Rubin G. M., Spradling A. C. Nucleic Acids Res., **11**, 6341 (1983).
17. Bender W., Spierer P., Hogness D. S. J. Mol. Biol., **168**, 17 (1983).
18. Lindsley D., Grell R. Genetic Variations of *Drosophila melanogaster*, published by Carnegie Inst., Washington, 1968.
19. Goldberg D. A. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 5794 (1980).
20. Benyajati C., Wang N., Reddy A., Weinberg E., Sofer W. Nucleic Acids Res., **8**, 5649 (1980).
21. Benyajati C., Spoerel N., Hamerle H., Ashburner M. Cell, **33**, 125 (1983).
22. Spradling, Rubin. Cell, **34**, 47 (1983).
23. Bingham P. M., Kidwell M. G., Rubin G. M. Cell, **29**, 995 (1982).
24. Simmons M., O'Hare K., Rubin G. M., personal communication.
25. Ashburner M., Thompson J. N. In: The Genetics and Biology of *Drosophila*, Academic Press, Vol. 2a, pp. 2 (1978).
26. Zucker C., Rubin G. M., personal communication.
27. Fullilove S. L., Jacobson A. G. In: The Genetics and Biology of *Drosophila*, Academic Press, Vol. 2c, pp. 106 (1978).
28. Southern E. M. J. Mol. Biol., **98**, 503 (1975).
29. Gall J. G., Pardue M. L. In: Methods in Enzymology, Academic Press, Vol. **21D**, pp. 470 (1971).
30. Langer-Safer P. R., Levine M., Ward D. C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **79**, 4381 (1982).
31. Hazelrigg T., Levis R., Rubin G. M., personal communication.

ВЫСОКОЭФФЕКТИВНЫЙ ПЕРЕНОС ГЕНОВ В КЛЕТКИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Корнелия Горман

1. Введение

По мере развития и совершенствования рекомбинантной технологии особую важность приобрели исследования, направленные на разработку методов переноса генов в эукариотические клетки. Данная глава посвящена описанию современных методических процедур, позволяющих осуществлять перенос генов с помощью векторов невирусной природы; особое внимание уделено двум наиболее распространенным методам — «кальций-фосфатному» и «ДЕАЕ-декстрановому». Описаны векторы, применяющиеся в самых разных экспериментах по генетическому переносу, и проведен подробный анализ соответствующих методик. Транспозированные гены могут сохраняться в клетке непродолжительное время, а могут и стабильно изменять ее генетическую структуру. Для временной (*transient*) трансформации ДНК, вводимой в культивируемые клетки, необязательно интегрироваться в клеточный хроматин для того, чтобы экспрессировать заключенную в ней генетическую информацию. Экспрессия введенной плазмидной ДНК начинается через 12 ч после ее проникновения в клетку и может продолжаться в клетках млекопитающих в общей сложности в течение 80 ч. При перманентной трансформации плазмидная ДНК внедряется в клеточный геном — возникает стабильно трансформированная клеточная линия. Ниже обсуждаются возможности и области применения этих двух экспериментальных приемов — временной и стабильной трансформации клеток млекопитающих. Выбор же конкретной методики, очевидно, зависит от поставленной экспериментальной задачи. В настоящей главе мы рассмотрим также вопросы, связанные с решением важной проблемы — повышения эффективности переноса хромосомных генов.

Многие эксперименты предполагают использование в качестве источника генетического материала клеточной ДНК. В этом случае селекция трансформантов должна основываться на фенотипических изменениях, которые возникают в реципиентных клетках после введения в них клеточной ДНК. Успешное проведение подобных экспериментов требует высокоэффективной стабильной трансформации. Поэтому в ряде случаев целесообразнее использовать плазмидный маркер для котрансфекции с геномной ДНК: первичный скрининг трансформированных кле-

ток на доминантно маркированный вектор позволяет легко избавиться от фона нетрансформированных клеток. Затем, если это необходимо, можно провести вторичный скрининг на ожидаемые фенотипические изменения. Как и в случае большинства новых методов, в исследовательской среде уже сформировалось свое мнение о всех «за» и «против» любого из перечисленных выше подходов. Поэтому мы постараемся быть предельно объективными в анализе сильных и слабых сторон предлагаемых экспериментальных приемов.

2. Векторы, используемые для экспрессии чужеродных генов в клетках млекопитающих

Все плазмидные векторы, используемые в экспериментах по генетическому переносу, содержат четыре основных функциональных компонента. Во-первых, это прокариотические последовательности, представляющие бактериальную область начала репликации и маркер лекарственной устойчивости. Эти последовательности обеспечивают размножение и селекцию плазмид в бактериальном хозяине. Во-вторых, это эукариотические элементы, контролирующие инициацию транскрипции, в частности промоторные и энхансерные последовательности [1]. Третий тип функциональных компонентов большинства экспрессирующих векторов — последовательности, обеспечивающие процессинг транскриптов. Далеко не все векторы содержат интроны для контроля возможного сплайсинга, однако сигналы полиаденилирования обязательно должны присутствовать, поскольку лишь полиаденилированные транскрипты эффективно транслируются в клетках млекопитающих. И наконец, четвертый компонент — это тест-ген. Из приведенных ниже примеров мы увидим, что в его роли могут выступать бактериальный ген, поставленный под контроль эукариотического элемента, комплементарная ДНК-копия специфической РНК или даже клонированный фрагмент геномной ДНК.

2.1. Векторы pSV2

Широкое распространение получили эукариотические векторы, сконструированные на базе вектора-прототипа pSV2 (Ховард и Берг, неопубликованные результаты). Схема этого вектора приведена на рис. 1. Прокариотические последовательности, которые несет pSV2, включают ген устойчивости к ампициллину Amp^R и область начала репликации бактериальной плазмиды pBR322. Во всех векторах семейства pSV2 указанные последовательности занимают область размером в 2295 нуклеотидных пар, ограниченную позициями 323—2618 (см. полную нуклеотидную последовательность pSV2cat, приведенную в при-

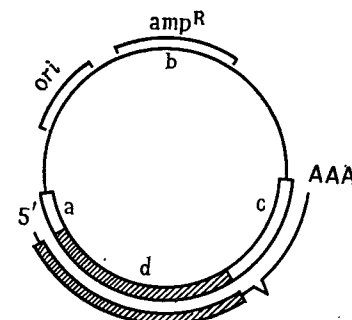


Рис. 1. Вектор семейства pSV2. *a* — промотор ранних генов SV40 (область 1—323 нуклеотидной последовательности pSV2cat); *b* — область 324—3369, включающая бактериальные последовательности, ответственные за репликацию (*ori*) и ген amp^R из pBR322; *c* — область 3370—4217, содержащая сигнал полиаденилирования и интрон малого т-антигена SV40; *d* — клонированный тест-ген, находящийся под транскрипционным контролем промотора ранних генов SV40. В составе pSV2cat ген CAT занимает область 4218—5003.

ложении). Для инициации синтеза РНК в клетках млекопитающих используется промотор ранних генов вируса SV40. Этот участок в дополнение к сайту инициации транскрипции содержит также 72-нуклеотидный повтор-энхансер; общая длина промоторного участка — 323 нуклеотида (область 1—323 нуклеотидной последовательности pSV2cat, см. приложение). Векторы на базе pSV2 содержат донорно-акцепторную последовательность сплайсинга в форме интрона малого т-антигена SV40. В векторе pSV2cat этот 610-нуклеотидный фрагмент ограничен позициями 3606—4217. К нему примыкает 988-нуклеотидный фрагмент (позиции 2618—3606 на карте pSV2cat), несущий сигнал полиаденилирования из ранней области SV40. Остальная часть плазмиды (область 4217—0) представляет собой участок для клонирования желаемой кодирующей последовательности.

2.2. Варианты конструкций

Приведенные выше примеры иллюстрируют в целом те функциональные компоненты, которыми должен обладать вектор, используемый для экспрессии чужеродных генов в клетках млекопитающих. Понятно, что конкретные векторы могут отличаться друг от друга теми или иными конструктивными особенностями. Например, в их состав могут входить гены, детерминирующие различную лекарственную устойчивость: к ампициллину, тетрациклину или хлорамфениколу. Выбор промотора для экспрессирующего вектора определяется типом реципиентной клетки или же целями исследования. В векторах семейства pSV2 используется промотор ранних генов SV40. Этот регуляторный элемент был выбран потому, что, во-первых, он хорошо изучен

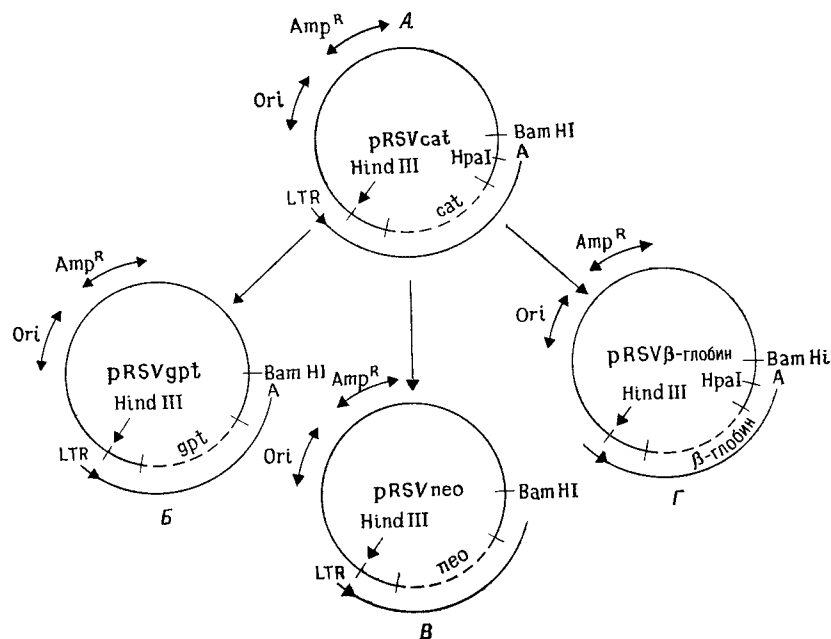


Рис. 2. Векторы, в которых в качестве промотора используется длинный концевой повтор (LTR) вируса саркомы Рауса (RSV). А. Вектор для временной экспрессии pRSVcat. Б, В. Векторы pRSVgpt и pRSVneo, обеспечивающие возможность доминантной селекции. Г. Вектор pRSV-β-глобин позволяет поставить под контроль RSV кодирующую последовательность любого интересующего гена. Нуклеотидная последовательность pRSVneo приведена в приложении.

Все указанные векторы имеют идентичную структуру в области 1—4241.

и, во-вторых, были основания предполагать, что он транскрипционно активен во многих типах клеток. Между тем углубленные исследования вирусных промоторов выявили для многих из них определенную видовую избирательность. Эта избирательность оказалась тесно связанной с функционированием других контролирующих генетических элементов, называемых энхансерами. Энхансеры интенсивно изучаются, и накопленные к настоящему времени данные говорят о том, что промоторная последовательность для экспрессирующего вектора должна коррелировать с типом реципиентной клетки [1]. Так, например, промотор ранних генов SV40 прекрасно работает в клетках приматов, но гораздо менее эффективен в клетках мыши. Для того же, чтобы получить высокий уровень экспрессии в мышечных клетках, следует использовать в качестве промотора длинный концевой повтор (LTR — от англ. *long terminal repeat*) вируса саркомы мышей Молони (MSV) [2]. Наиболее широкой специфичностью, по-видимому, обладает промоторная зона LTR

вируса саркомы Рауса (RSV) [3]. Этот промотор функционирует во всех исследованных клетках млекопитающих и даже в клетках организмов из других таксономических групп, например в клетках дрожжей. Семейство векторов, содержащих универсальный промотор RSV, показано на рис. 2. Нуклеотидная последовательность pRSVneo приведена в приложении в конце главы. Все RSV-векторы [4] имеют одинаковую первичную структуру в области 1—4241.

2.3. Индуцибельные промоторы

В ряде случаев высокоэффективная конститутивная экспрессия чужеродного гена оказывается нежелательной. В частности, высокое содержание в клетке продуктов некоторых генов при их конститутивной экспрессии может обуславливать цитотоксический эффект. Поэтому довольно часто для регулирования экспрессии клонированного гена, введенного в клетки млекопитающих, используют индуцибельные промоторы. Эти контролирующие элементы могут быть состыкованы с любой кодирующей последовательностью; в результате транскрипционная активность последней оказывается под контролем соответствующих стимулов. В качестве примеров индуцибельных промоторов, которые с успехом используются в экспрессирующих векторах, приведем промоторы белков теплового шока [5], промоторы металлотионеинов мыши и человека [6—8], промотор гормона роста [9], а также длинный концевой повтор вируса рака молочной железы мыши (MMTV) [10]. Эти контролирующие генетические элементы используются для экспрессии генов как во временных трансформантах, так и в стабильно трансформированных клетках.

Следует, однако, иметь в виду, что индуцирующие стимулы могут так или иначе влиять на нормальные внутриклеточные процессы. Наиболее ярко это проявляется в случае индукции с помощью теплового шока, поскольку большинство клеточных генов также находится под контролем — позитивным или негативным — этого управляющего стимула. В определенной степени это справедливо и для индукции металлотионеиновых генов мыши или человека ионами тяжелых металлов. Пожалуй, несколько более высокую специфичность обнаруживает стимуляция транскрипции с помощью контролирующих элементов, работающих «в паре» со стероидами. Эти элементы присутствуют в промоторе металлотионеинового гена человека (но не мыши), а также в промоторах MMTV и гормона роста. Подводя итог сказанному, необходимо подчеркнуть, что исследователь должен выбирать вектор, исходя из поставленной задачи и конкретной цели эксперимента. Контролирующие элементы любого вектора можно заменить или модифицировать согласно этим целям.

2.4. Векторы для временной экспрессии и для стабильной трансформации

При переносе генов в клетки млекопитающих обычно используются два экспериментальных подхода. Временная экспрессия позволяет анализировать генный продукт — РНК или белок — в течение нескольких часов после проникновения ДНК в клетку. Плазмидные векторы способны функционировать в ядре, не интегрируясь в клеточный хроматин, в течение 80 ч. Снискали популярность подобные векторы, кодирующие такие маркерные белки, которые либо не свойственны клеткам млекопитающих, либо легко детектируются на общем фоне хозяйских белков. Этот методический прием позволяет провести быстрый скрининг трансформантов на экспрессию генов, заключенных в плазмиде. В качестве маркерных генов для эукариотических экспрессирующих векторов широко используются различные бактериальные гены. В частности, две наиболее распространенные эукариотические системы временной трансформации основаны на использовании двух бактериальных генов — гена хлорамфениколацетилтрансферазы (CAT) и гена *lacZ* *E. coli*, кодирующего β-галактозидазу. Обычно в качестве вектора для осуществления временной экспрессии используют производные pSV2, несущие какой-нибудь из этих генов. (Все векторы семейства pSV2 имеют идентичную последовательность нуклеотидов в области 1—4127 — см. последовательность pSV2cat в приложении. В векторе pSV2cat область 4128—5003 кодирует ген CAT.) Методы определения продуктов каждого из указанных генов подробно обсуждаются в разд. 7.1 и 7.2.

Две наиболее популярные векторные системы для стабильной трансформации предполагают использование доминантных селективных маркеров — бактериальных генов, продукты которых синтезируются *de novo* в культивируемых клетках млекопитающих и обеспечивают этим клеткам селективное преимущество. Такими маркерами служат гены *E. coli neo^R* или *gpt*. Подробное обсуждение соответствующих методик приводится в разд. 8.2 и 8.3.

3. Приготовление ДНК

Помимо хорошего «самочувствия» клеток (см. разд. 4) важным фактором, влияющим на успех эксперимента, является состояние плазмидной ДНК. Целесообразно проверить препараты ДНК электрофоретически (не содержат ли они РНК и хромосомную ДНК). Необходимо и дальше периодически проверять препараты, чтобы быть уверенным, что плазмидная ДНК находится в сверхспирализованной форме. Рекомендуем также дважды отцентрифугировать ДНК в градиенте плотности хлористого цезия. Известно множество методов выделения плазмидной

ДНК, однако, на наш взгляд, наиболее стабильные результаты при высоком качестве ДНК обеспечивает метод лизиса бактерий Тритоном. Соответствующие экспериментальные процедуры описаны в табл. 1.

Таблица 1. Получение плазмидной ДНК

1. Из отдельной бактериальной колонии, содержащей плазмиду, нарастите при 37°C 5 мл ночной культуры. Внесите эту культуру в 800 мл супербульона¹⁾ и инкубируйте при 37°C в течение 36 ч при интенсивном встряхивании.
2. Осадите бактерии центрифугированием при 4°C в роторе Sorvall G30 (или эквивалентном) при 5000 об/мин в течение 10 мин.
3. Ресуспенсируйте осадок в 100 мл TE²⁾ и снова центрифугируйте в том же режиме. На этой стадии бактериальный осадок можно хранить при —20°C.
4. Ресуспенсируйте осадок на льду в 9 мл TES³⁾; суспензию тщательно перемешайте.
5. Добавьте 0,9 мл раствора лизоцима в TES (10 мг/мл) и инкубируйте на льду в течение 5 мин.
6. Добавьте 3,7 мл 0,25 М ЭДТА pH 8,0; инкубируйте на льду в течение 5 мин.
7. Добавьте 14,5 мл охлажденного раствора Тритона⁴⁾. Перемешайте и оставьте на льду на 10 мин.
8. Центрифугируйте при 4°C в роторе SW27 (или эквивалентном) при 25 000 об/мин в течение 30 мин.
9. Надосадочную жидкость перенесите в полипропиленовую пробирку на 50 мл и добавьте такое количество буфера TE, чтобы вес препарата достиг 30,17 г. Добавьте 28,14 г CsCl и тщательно перемешайте. Добавьте 4,5 мл раствора этидиумбромид (10 г/мл) в 10 мМ трис-HCl pH 7,5.
10. При помощи пипетки перенесите смесь в полиалломерную центрифужную пробирку с крышкой для ротора Beckman VTi50 или Ti60. Режим центрифугирования для вертикального ротора — 18 ч при 45 000 об/мин и 20°C, для ротора Ti 60 — 60 ч при 35 000 об/мин.
11. После центрифугирования перенесите пробирку под источник УФ-излучения. С помощью шприца на 20 мл с иглой № 19, проколите стенку пробирки против нижней полосы, которая соответствует плазмидной ДНК, и отберите 4—5 мл раствора из этой зоны.
12. Повторите центрифугирование в CsCl (см. п. 13) или экстрагируйте этидий изопропанолом, насыщенным CsCl в такой же концентрации, что и при центрифугировании. Затем диализуйте препарат против TE, чтобы удалить CsCl, добавьте 1/10 объема 5 М NaCl и два объема этанола и оставьте на ночь при —20°C. Осадок соберите центрифугированием и высушите на воздухе, чтобы удалить следы этанола.
13. Для повторного центрифугирования приготовьте раствор CsCl в TE (1,08 г/мл). К этому раствору добавьте раствор этидиумбромид (10 мг/мл) из расчета 0,17 мл на 1 мл взятого TE и заполняйте им центрифужные пробирки с препаратами плазмидной ДНК для ротора VTi50 или VTi65.

¹⁾ Супербульон готовят из концентрированных растворов А и Б. Раствор А содержит 120 г триптона; 240 г дрожжевого экстракта; 50 мл глицерина в 900 мл воды. Раствор Б содержит 125 г K_2HPO_4 , 38 г KH_2PO_4 и воды до 1 л. Каждый раствор автоклавируют отдельно и затем смешивают в отношении А : Б = 9 : 1; pH суммарного раствора должен быть 7,2.

²⁾ TE: 10 мМ трис-HCl pH 7,9; 1 мМ ЭДТА.

³⁾ TES: 50 мМ трис-HCl pH 7,5; 40 мМ ЭДТА; 25% (по весу) сахара.

⁴⁾ Раствор Тритона готовят, смешивая 1 мл 10% Тритона; 31,5 мл 25 мМ ЭДТА; 5 мл 1 М трис-HCl pH 7,9 и 62,5 мл воды; готовый раствор стерилизуют фильтрованием.

4. Культивирование клеток

Независимо от выбранной методики эксперимента в первую очередь следует детально изучить ростовые особенности клеток, которые предполагается использовать в качестве реципиентов чужеродных генов. Хотя на первый взгляд это требование кажется само собой разумеющимся, мы акцентируем на нем внимание, поскольку важность этого этапа работы чрезвычайно велика. Условия культивирования клеток для трансфекции — самый вариабельный параметр во всей схеме эксперимента по генетическому переносу, и знание тех или иных нюансов, касающихся выращивания конкретных клеток, окажет неоценимую помощь в преодолении неожиданно возникших экспериментальных трудностей.

Не вызывает сомнения, что клетки, растущие в монослое, т. е. в виде одинарного слоя, распластанного на подложке, — наиболее подходящий объект для трансфекции. Такие клетки проще использовать в эксперименте, чем клетки, культивируемые в суспензии. Охарактеризованные стабильные клеточные линии предпочтительнее свежих эксплантатов — так называемых первичных культур. Это связано с тем, что первичные клетки не адаптированы к росту *in vitro* и их ростовой цикл в культуре с течением времени сильно замедляется. В то же время наблюдается строгая корреляция между скоростью роста культуры и способностью клеток акцептировать ДНК. Поэтому мы рекомендуем начинать эксперименты по генетическому переносу с такими стабильными клеточными линиями, как человеческие клетки HeLa (рак шейки матки, эпителиальный тип), мышинные фибробласты 3T3 или 3T6 или же клетки печени мыши, известные как L-клетки.

4.1. Растворы для культивирования клеток

4.1.1. Среды

Для трансфекции используют различные среды; пожалуй, более других распространена модифицированная Дульбекко среда Игла (DMEM) — ее состав приведен в табл. 2. Единственное ограничение, касающееся использования сред, следующее: любая среда, содержащая CaCl_2 (например, среда RPMI), непригодна для трансфекции кальций-фосфатным методом. Избыток кальция приведет к образованию плотного осадка. Для приготовления сред следует брать только бидистиллят. Лучше, если предварительно вода была деионизована. Обязательно охладите воду после дистилляции и лишь затем приступайте к приготовлению сред. pH дистиллированной воды должен быть приблизительно 5,5. Используйте только высокочистые вещества

Таблица 2. Среда Игла в модификации Дульбекко¹⁾

Компоненты	мг/мл
Соли	
CaCl_2 (безводный)	200,00
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,10
KCl	400,00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	200,00
NaCl	6400,00
NaHCO_3	3700,00
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	125,00
Другие компоненты	4500,00
Глюкоза	15,00
Феноловый красный	
Аминокислоты	
L-аргинин-HCl	84,00
L-цистеин	48,00
L-глутамин	580,00
Глицин	30,00
L-гистидин-HCl-H ₂ O	42,00
L-изолейцин	105,00
L-лейцин	105,00
L-лизин-HCl	146,00
L-метионин	30,00
L-фенилаланин	66,00
L-серин	42,00
L-треонин	95,00
L-триптофан	16,00
L-тирозин	72,00
L-валин	94,00
Витамины	
D-пантотенат кальция	4,00
Холинхлорид	4,00
Фолиевая кислота	4,00
i-инозитол	7,20
Никотинамид	4,00
Пиридоксаль HCl	4,00
Рибофлавин	0,40
Тиамин HCl	4,00

¹⁾ Комментарии по поводу чистоты воды, забуферивания среды, добавления антибиотиков и сыворотки см. в тексте.

и растворяйте их отдельно, перед тем как смешивать в нужной пропорции. После тщательного перемешивания компонентов измерьте pH среды. Среда DMEM должна иметь pH в интервале 7,5—7,7; в атмосфере 10% CO₂ этот показатель устанавливается в интервале 7,3—7,4. Для успешной трансфекции величина pH среды очень важна. Для среды DMEM оптимум pH составляет как раз 7,3—7,4. Довести pH до этой величины можно также, добавив в среду Нерес-буфер pH 7,2 до концентрации 50 мМ. Стерилизуют среды фильтрованием, пропуская раствор через стерильный фильтр (размер пор — 0,2 мкм) в специальной стерильной комнате или в ламинарном боксе. Хранят среды герметично закрытыми. Непосредственно перед использованием добавляют сыворотку, пенициллин (100 мкг/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл). Обычно для культур клеток используют бычью фетальную сыворотку.

4.1.2. Трипсин

Трипсин применяют для выделения клеток из монослоев, как описано в разд. 4.2.1. Используют 0,025%-ный раствор трипсина в физиологическом солевом растворе. Обычно бывает удобно приготовить 10-кратный раствор и разбавлять его перед использованием. Работайте только с тем трипсином, который имеет квалификацию «для культур тканей» (*tissue culture grade*). Некоторые клетки легче субкультивировать, если использовать раствор трипсина с ЭДТА (рабочий раствор содержит 0,5 г трипсина и 0,2 г ЭДТА на 1 литр физиологического раствора).

4.1.3. Солевой раствор на основе фосфатного буфера (PBS)

PBS используется в качестве изотонического раствора для промывки клеток. 10-кратный раствор содержит 80 г NaCl, 20 г KCl, 15 г Na₂HPO₄ и 20 г KH₂PO₄ в 1 л воды.

4.2. Субкультивирование клеток из монослойной культуры

Когда клетки по мере роста и деления заполняют почти всю поверхность культурального сосуда или камеры, говорят, что сформировался полный монослой. Клетки, которым свойствен феномен контактного торможения, перестают расти, как только их плотность оказывается достаточной для контакта соседних клеток друг с другом. Клетки, не подверженные контактному торможению, продолжают делиться и формируют плотные участки трехмерного роста или фокусы. Для экспериментов по переносу генов клетки следует субкультивировать на стадии, предшествующей формированию полного монослоя, то есть до того

момента, когда их рост начнет замедляться вследствие контактного торможения. Субкультивирование подразумевает выделение клеток из монослоя путем трипсинизации, подсчет их количества и пересев при более низкой плотности.

4.2.1. Трипсинизация клеток

Подогрейте все растворы на водяной бане до 37°C. Удалите из культурального сосуда с клетками среду культивирования и добавьте раствор (1×) трипсина (для чашки диаметром 9 см достаточно 1 мл, для 25 см² флакона — 0,5 мл). Поместите клетки обратно в термостат на 37°C. Через 1—2 мин осмотрите клетки под микроскопом — они должны округлиться и обособиться друг от друга. Теперь их можно легко снять с подложки, слегка встряхнув чашку. Если при этом клетки не отделяются от поверхности сосуда, снова поместите их в инкубатор и подождите минуту-другую. Когда все клетки отделятся от субстрата, остановите трипсинизацию, добавив 0,5—1 мл среды DMEM, содержащей 10% сыворотки. На этой стадии лучше клетки перенести в стерильную пробирку на 50 мл. Добавьте среду до объема исходной культуры. Если клетки выращивали на 9-см чашке, доведите объем до 10 мл. Теперь клетки можно сосчитать и пересеять.

4.2.2. Подсчет клеток

Клетки подсчитывают для того, чтобы отобрать для субкультивирования точно известное их количество. В экспериментах по трансфекции это очень важно, так как в момент контакта с ДНК клетки должны находиться в логарифмической фазе роста. Для большинства клеток, культивируемых в монослое, при использовании в экспериментах по трансфекции рекомендуемая плотность культуры должна составлять 3—5·10⁵ клеток на чашку диаметром 9 см или приблизительно 10⁴/см². Если у вас есть счетчик клеток Coulter, не составляет труда научиться им пользоваться. Если же подобного прибора нет, для подсчета клеток можно воспользоваться гемоцитометром. Метод заключается в подсчете под микроскопом количества клеток в очень малом объеме. Гемоцитометр представляет собой предметное стекло с нанесенными на него в виде прямоугольной сетки штрихами, ограничивающими различные по размеру квадраты поверхности. Между этим стеклом и накладываемым сверху покровным стеклом обеспечивается постоянный зазор в 0,1 мм. Этот зазор легко заполняется суспензией клеток благодаря действию капиллярных сил. Клетки в каждом квадрате подсчитывают под микроскопом с помощью ручного счетчика. Зная площадь квадрата и, следовательно, соответствующую

ший ему объем клеточной суспензии, нетрудно вычислить концентрацию клеток в данной суспензии. Гемоцитометр имеет девять больших квадратов.

A	B	A
B	C	B
A	B	A

При условии, что камера заполнена правильно, каждому большому квадрату соответствует объем 10^{-4} мл. Итак, отберите небольшую каплю однородной клеточной суспензии. Это удобно сделать при помощи пастеровской пипетки. Аккуратно заполните суспензией пространство между предметным и покровным стеклами, так чтобы излишек жидкости не попал на наружную поверхность стекол. (Помните о том, что пипетка более не стерильна и ее нельзя использовать повторно.) Обычно подсчитывают число клеток в квадратах С и В и полученные величины усредняют. Затем это количество умножают на 10^4 , чтобы получить число клеток в 1 мл среды. Теперь можно легко рассчитать фактор разведения, чтобы получить культуру требуемой плотности. Для обычного субкультивирования большинство клеток высевают при плотности $0,5-1,0 \cdot 10^5$ клеток на 9-см чашку (приблизительно 10^3 клеток/см²). Для экспериментов по трансфекции клетки следует высевать при несколько более высокой плотности, чтобы они находились в логарифмической фазе роста. Как правило, эта величина составляет $5 \cdot 10^5$ клеток на 9-см чашку или 10^4 /см². Если посеять клетки при указанной плотности, большинство культур формирует полный монослой через 4—7 дней культивирования. Желательно записывать количество пассажей каждой линии клеток. Данный параметр удобно регистрировать, если включить это изменяющееся число в обозначение клеток. При многократном субкультивировании способность клеток захватывать ДНК — как плазмидную, так и вирусную — может изменяться. Для большинства экспериментов по трансфекции пригодны клетки, прошедшие не более 15 циклов последовательного субкультивирования.

5. Кальций-фосфатный метод

Это наиболее широко используемый метод [11]. Его можно с успехом применять для большинства клеток в монослойной культуре и для ряда клеток, культивируемых в суспензии. Кальций-фосфатный метод весьма эффективен как для осуществления временной экспрессии, так и для стабильной трансформации

ции клеток. Универсальность методики сделала ее весьма популярной. Однако следует заметить, что здесь несколько труднее выявить параметры, которые наиболее важны с точки зрения успешного проведения эксперимента, чем в ДЕАЕ-декстрановом методе.

5.1. Растворы для кальций-фосфатного метода

1. *Солевой раствор с Нерес-буфером (HBS)*. $10\times$ раствор содержит 8,18% NaCl (по весу), 5,94% *Нерес* (по весу) и 0,2% Na₂HPO₄ (по весу); его разливают по 50 мл и хранят при 4°C. Сухой Нерес для приготовления этого раствора лучше всего хранить обезвоженным при 4°C. Для работы приготовьте из $10\times$ запасного раствора $2\times$ HBS, доведите pH до 7,12 1 н NaOH и простерилизуйте фильтрованием через нитроцеллюлозную мембрану. HBS следует готовить тщательно и аккуратно, поскольку величина pH имеет принципиальное значение для эффективной трансфекции.

2. *2M CaCl₂*. Раствор стерилизуют фильтрованием через нитроцеллюлозную мембрану и хранят при 4°C.

3. *15% глицерин/HBS* приготавливают, смешивая 30 мл 50% глицерина (по весу), 50 мл $2\times$ HBS (pH 7,12) и 20 мл воды. Раствор стерилизуют фильтрованием и хранят при 4°C.

5.2. Основная методика

Известно много вариантов методики с использованием фосфата кальция. Мы приводим две наиболее распространенные методические разработки. Целесообразно опробовать каждую из них на конкретной линии клеток. Такое предварительное тестирование можно провести с использованием одной из систем временной экспрессии, которые описаны в разд. 7.

1. За день до постановки эксперимента по трансфекции (1-й день) пересейте клетки при плотности 10^4 /см².

2. На второй день замените среду культивирования свежей средой, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки. Через 3 ч после этого добавляют ДНК.

3. Приготовьте кальций-фосфатный преципитат ДНК, используя запасные растворы, подогретые до комнатной температуры. Для флакона 25 см², содержащего 5 мл среды, понадобятся следующие растворы. В пробирку А внесите раствор, содержащий 5 мкг ДНК, затем 31 мкл 2M CaCl₂ и доведите суммарный объем водой до 0,25 мл. В пробирку Б внесите 0,25 мл $2\times$ HBS. Для получения преципитата содержимое пробирки А смешивают с HBS в пробирке Б. Такой порядок действий имеет принципиальное значение. Раствор ДНК по каплям

добавляют к HBS. Преципитат формируется немедленно. Если он выглядит плотным и непрозрачным (должен выглядеть полупрозрачным), значит pH приготовленного HBS не тот, который требуется.

4. Нанесите преципитат на клетки, слегка наклоняя чашку и добавляя его в среду. Немедленно поставьте клетки обратно в термостат, чтобы pH не изменился.

5. Инкубируйте клетки в течение 3,5—4 ч.

6. Осмотрите образовавшийся преципитат. В идеале он напоминает мелкие гранулы, которые покрывают наружную поверхность клеток. Если pH среды слишком кислый, преципитат не образуется; при защелачивании среды формируется грубодисперсный флотирующий преципитат. Характер преципитата также сильно зависит от состояния ДНК (см. разд. 3).

7. Промойте клетки средой без сыворотки. Чтобы повысить эффективность трансфекции на этой стадии, можно подвергнуть клетки глицириновому шоку. Для этого добавьте во флакон с клетками 0,5 мл 15%-ного раствора глицирина в HBS и инкубируйте при 37°C. Оптимальное время инкубации в зависимости от типа клеток составляет от 30 сек до 3 мин. Так, например, клетки NIH/3T3 и CV1 надо инкубировать 2 мин, а клетки HeLa — 30 сек. «Шок-раствор» необходимо удалить до того момента, когда клетки начнут сжиматься. Затем клетки отмывают и заливают свежей средой.

8. На 4-й день клетки собирают и проводят тест на экспрессию, как описано в разд. 7.

5.3. Варианты основной методики

5.3.1. Длительный контакт клеток с кальций-фосфатным преципитатом

Описан и широко применяется вариант методики, предполагающий длительное — в течение 18 ч — инкубирование клеток с кальций-фосфатным преципитатом. По истечении времени инкубации преципитат тщательно отмывают и клетки заливают свежей средой. В этом случае добавление глицирина оказывается менее эффективным с точки зрения повышения эффективности экспрессии трансформированной ДНК (по данным теста на временную экспрессию, см. разд. 7).

5.3.2. Обработка клеток бутиратом

Обработка клеток после трансфекции бутиратом увеличивает количество клеток, способных экспрессировать чужеродную ДНК, по меньшей мере в три раза. Это означает, что число клеток в популяции, дающих положительный сигнал в тесте

на временную экспрессию, может достигать 40% [12]. Кроме того, обработка бутиратом может специфически повышать транскрипционную активность целого ряда плазмид, в состав которых входят контролирующие генетические элементы вирусов SV40, полиомы или папилломы. Методика не отличается от той, которая изложена в разд. 5.2, вплоть до стадии 7. После глициринового шока к клеткам добавляют свежую среду и затем раствор бутирата натрия. В этом растворе клетки оставляют на ночь. На следующее утро бутират удаляют, клетки промывают и заливают свежей средой. Требуемая концентрация бутирата зависит от типа клеток: так, к клеткам CV1 добавляют 10 мМ раствор, к NIH/3T3 и HeLa — 5 мМ, а к CHO (клеткам яичника китайского хомячка) — 2 мМ раствор бутирата. Удобнее всего пользоваться концентрированным (0,5 М) запасным раствором бутирата натрия, приготовленным одним из следующих способов.

1. Возьмите 1,5 мл масляной кислоты (мол. масса 88) и добавляйте раствор NaOH, пока pH раствора не достигнет 7,0. Доведите объем до 25 мл и простерилизуйте раствор фильтрованием.

2. Растворите в воде 1,375 г бутирата натрия (мол. масса 109), доведите pH раствора до 7,0; конечный объем раствора — 25 мл. Стерилизуйте фильтрованием.

Чтобы получить 10 мМ раствор, добавьте 200 мкл концентрированного раствора в 10-см чашку, содержащую 10 мл среды.

5.3.3. Обработка хлорохином

Обработка хлорохином также используется для повышения эффективности трансформации [13]. Поскольку этот метод можно применять как с кальций-фосфатной методикой, так и с ДЕАЕ-декстрановой процедурой, мы обсудим его позднее.

6. ДЕАЕ-декстрановый метод

Эта методика нашла широкое применение для увеличения эффективности инфицирования клеток вирусами. Через некоторое время была разработана модифицированная процедура, позволяющая с высокой эффективностью вводить в клетки и плазмидную ДНК [14]. Следует, однако, подчеркнуть, что с помощью данного метода не удается получать стабильно трансформированные клеточные линии. Вместе с тем он весьма удобен для осуществления временной экспрессии и с успехом использовался не только в работе с монослойными клеточными культурами, но и для трансфекции лимфоцитов [15].

6.1. Растворы для DEAE-декстранового метода

1. *DEAE-декстрановый концентрированный раствор.* Содержит 100 мг/мл DEAE-декстрана в буфере TBS. Раствор стерилизуют фильтрованием и хранят в аликвотах при -20°C .
2. *Буфер TBS:* 25 мМ трис-HCl pH 7,4; 137 мМ NaCl; 5 мМ KCl; 0,7 мМ CaCl_2 ; 0,5 мМ MgCl_2 ; 0,6 мМ Na_2HPO_4 .

6.2. Методика трансфекции для монослойной культуры клеток на 10-см чашке

1. Промойте клетки средой DMEM. Среда не должна содержать сыворотки; промывать следует четыре раза, после чего отмойте клетки один раз буфером TBS. Присутствие сыворотки на этой стадии может ингибировать трансфекцию.
2. Приготовьте раствор, содержащий 20 мкг ДНК в 250 мкл TBS и 80 мкл DEAE-декстранового концентрированного раствора.
3. Смешайте этот раствор с 4 мл среды DMEM (без сыворотки) и пипеткой нанесите на отмытые клетки.
4. Инкубируйте клетки при 37°C в течение 3 ч. Это оптимальная продолжительность инкубации для большинства монослойных клеточных культур.
5. Промойте клетки дважды TBS и добавьте свежую среду.

6.3. Варианты основной процедуры

6.3.1. Трансфекция лимфоцитов

1. Из запасного концентрированного раствора DEAE-декстрана (100 мг/мл) приготовьте раствор DEAE-декстрана в TBS (1 мг/мл) и храните его при 4°C .
 2. Следуйте п. 1 методики, описанной в разд. 6.2. Затем смешайте 250 мкл буфера TBS, содержащего 5 мг ДНК и 250 мкл раствора DEAE-декстрана (2 мг/мл).
 3. Суспендируйте 10^7 клеток в 0,5 мл полученного на стадии 2 раствора. Инкубируйте клеточную суспензию при комнатной температуре в течение 30 мин.
 4. Добавьте 4,5 мл TBS и осадите клетки центрифугированием.
 5. Промойте клетки дважды нормальной средой и высевайте в многоруночные планшеты.
- Продолжительность временной экспрессии может варьировать в зависимости от индивидуальных особенностей ДНК. Для DEAE-декстрановой трансфекции оптимальное время составляет 24–48 ч.

6.3.2. Обработка хлорохином

Хлорохин повышает эффективность экспрессии плазмидной ДНК, если обработать им клетки после трансфекции (как кальций-фосфатной, так и DEAE-декстрановой) [13]. Количество хлорохина, вероятно, придется подбирать для конкретного типа клеток, однако можно воспользоваться следующими обобщенными рекомендациями. Хлорохин (Sigma) может храниться в темноте в виде раствора (2 мг/мл) при 4°C в течение недели. Обычно используют 100-кратное разведение такого раствора, чтобы получить конечную концентрацию 200 мкг/мл в среде DMEM. Хорошие результаты были достигнуты при добавлении хлорохина непосредственно в раствор ДНК — при этом обеспечивается относительно непродолжительный контакт клеток с хлорохином. Токсический эффект хлорохина начинает сказываться через 4 ч инкубации.

6.3.3. Глицериновый шок после DEAE-декстрановой трансфекции

Не так давно было показано, что глицериновый шок после DEAE-декстрановой трансфекции ощутимо повышает уровень временной экспрессии [16]. Методика идентична процедуре, описанной в разд. 5.2, с той только разницей, что клетки собирают через 72 ч после трансфекции. Рекомендуется также увеличить количество используемой плазмидной тест-ДНК (от 15 до 25 мкг на 60 мм чашку).

7. Временная экспрессия

Мы уже упоминали, что на практике нередко возникает проблема выбора экспериментальной процедуры, для решения которой необходимо как-то оценить эффективность трансфекции различных типов клеток. Идеальный методический прием для подобной оценки — временная экспрессия; этот способ относительно прост и позволяет быстро определить целый ряд интересующих параметров. Тестируя экспрессию маркерного фермента, который кодируется плазмидной ДНК, можно сравнить различные методики трансфекции и выбрать наилучшую (применительно к конкретным условиям). Для реализации этого подхода оказалась полезной методология, давно отработанная на прокариотических системах. Контролирующие последовательности состыковывают с кодирующим участком гена какого-нибудь удобного с точки зрения идентификации маркерного белка; теперь функционально активный ген можно обнаружить энзиматическими методами. Этот подход в ряде случаев оказывается более чувствительным и точным в количественном отношении, чем измерение собственно транскрипционной активности гена.

Еще одно преимущество данного метода заключается в том, что он позволяет относительно легко анализировать влияние тех или иных изменений, вносимых в основную экспериментальную процедуру. Наибольшее распространение получили системы временной экспрессии на основе бактериальных генов. Основное их преимущество в том, что бактериальный продукт легко обнаружить на фоне эукариотических изомимов. В случае же систем с САТ такой проблемы вообще нет, поскольку отсутствует соответствующий животный белок. Две наиболее распространенные системы временной экспрессии описаны ниже. Известны также системы на основе генов галактокиназы *E. coli* [17], *gpt* [18] и *neo^R* [19], однако они менее употребимы ввиду сложности определения соответствующих продуктов. Тестировать временную экспрессию можно не только с помощью энзиматических методов, но и иммунологически — с использованием меченых антител. Так, иммунодетекция позволяет легко выявлять и идентифицировать такие маркеры, как САТ и β -галактозидаза. Помимо бактериальных маркеров для оценки эффективности трансфекции широко используют системы, экспрессирующие вирусные антигены.

7.1. Тест-системы с хлорамфеникол-ацетилтрансферазой

Этот ген кодирует устойчивость бактерий к хлорамфениколу. Он достаточно хорошо изучен; разработаны высокочувствительные методы определения соответствующей ферментативной активности. Поскольку кодирующая область гена невелика (700 пар нуклеотидов), несущие этот ген векторы легко могут быть модифицированы. Экспрессия бактериального гена САТ в клетках млекопитающих может служить тестом на активность промоторов в эукариотических векторах [20]. В векторах-прототипах pSV2cat [20] (рис. 1) и pRSVcat [3] (рис. 2) для осуществления транскрипции бактериального гена используются соответственно промотор SV40 и длинный концевой повтор вируса саркомы Рауса.

Процедура определения энзиматической активности САТ основана на использовании радиоактивного субстрата — [¹⁴C]хлорамфеникола и включает анализ ацетилированных продуктов реакции с помощью тонкослойной хроматографии (методика описана в табл. 3). Контрольный препарат САТ производит фирма PL Biochemicals. Кинетика реакции проиллюстрирована на рис. 3.

7.2. Определение β -галактозидазы

Кодирующая область бактериального гена β -галактозидазы также широко используется для маркирования векторов, предназначенных для временной экспрессии [21]. Конструирование

Таблица 3. Определение хлорамфеникол-ацетилтрансферазы

1. После трансфекции клеток одним из описанных выше методов клетки промойте PBS, соберите и перенесите в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку.
2. К осадку клеток добавьте 100 мкл 0,25 М трис-HCl pH 7,8.
3. Лизируйте клетки замораживанием — оттаиванием. Для этого пробирку с клетками погружают на 5 мин в спиртовую баню с сухим льдом и затем переносят на водяную баню, имеющую температуру 37°C. Цикл повторяют три раза.
4. Отцентрифугируйте, чтобы удалить остатки клеток; надосадочную жидкость сохраните для определения ферментативной активности. На этой стадии пробы можно хранить в замороженном состоянии при -20°C.
5. В зависимости от типа клеток и тестируемого промотора количество экстракта, взятого в реакцию, может варьировать. Реакционная смесь содержит:
70 мкл 0,25 М трис-HCl pH 7,8
35 мкл воды
20 мкл клеточного экстракта
1 мкКи [¹⁴C] хлорамфеникола (40—50 Ки/Ммоль) (NEN или Amersham)
20 мкл 4 мМ ацетил-CoA¹⁾
6. Инкубируйте смесь при 37°C в течение 10—30 мин. Время инкубации можно увеличить до 60 мин, если обеспечить реакцию достаточным для сохранения линейной кинетики количеством активного ацетил-CoA²⁾.
7. Экстрагируйте хлорамфеникол 1 мл этилацетата при интенсивном встряхивании в течение 30 с.
8. Открутите пробку на микроцентрифуге и отберите верхнюю органическую фазу, содержащую все формы хлорамфеникола (два моноацетата, диацетат и исходный хлорамфеникол, рис. 3).
9. Удалите этилацетат сушкой в вакууме. На это потребуется около 2 ч.
10. Ресуспенсируйте высушенные продукты в 20 мкл этилацетата³⁾ и нанесите на пластинки с силикагелем для ТСХ (такие пластинки производят, например, фирмы Baker или Merck).
11. Образцы хроматографируют⁴⁾ в системе хлороформ : метанол (95 : 5).
12. Пластинки высушивают на воздухе и экспонируют с рентгеновской пленкой в течение ночи. Относительное количество хлорамфеникола, переведенного в форму моноацетата, служит оценкой транскрипционной активности гена САТ и, следовательно, оценкой эффективности трансфекции.

¹⁾ 4 мМ раствор ацетил-CoA готовят, растворяя 1,5 мг сухого вещества в 0,5 мл воды.

²⁾ Ацетил-CoA — очень нестабильное вещество; можно использовать только свежеприготовленный раствор или раствор, который хранился замороженным при -20°C не более 10 дней.

³⁾ Этилацетат следует отбирать только стеклянной пипеткой.

⁴⁾ Хроматографическую камеру следует выстлать изнутри фильтровальной бумагой, чтобы уравновесить систему. Используйте только свежеприготовленный растворитель, так как хлороформ очень летуч.

векторов, содержащих этот ген, — занятие несколько более трудоемкое, чем в случае САТ-содержащих систем, ввиду гораздо большего размера кодирующего участка. В то же время чувствительность метода определения β -галактозидазы ниже, чем чувствительность САТ-теста. Определение β -галактозидазы служит хорошим контролем на компетентность клеток. Оба фер-

Определение CAT-активности в экстракте из 5×10^6 клеток

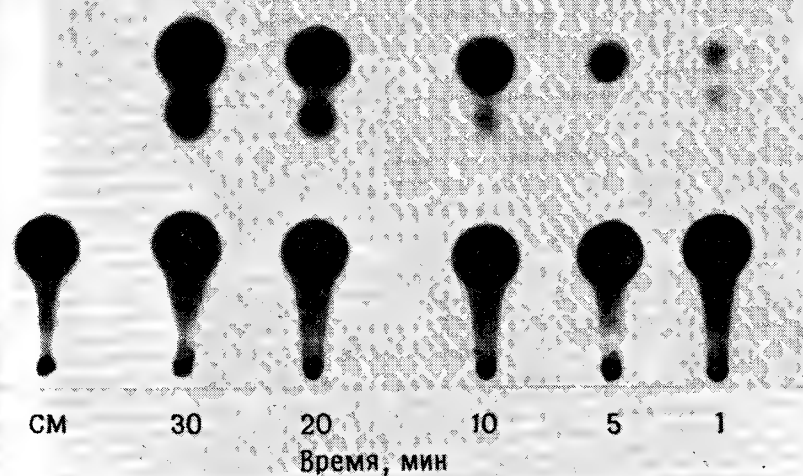


Рис. 3. Определение CAT-активности. Показана динамика накопления ацетилированных форм хлорамфеникола (CM) во времени. Тестируемые экстракты получены из клеток CV-1, трансформированных pRSVcat. Для описанного метода требуется всего лишь 1/20 часть экстракта, полученного с 9-см чашки; метод очень чувствителен и позволяет выявить менее 1 пкг функционального фермента.

мента — CAT и β -галактозидазу — можно определять в одном и том же клеточном экстракте.

1. Для определения β -галактозидазы клетки лизируют в 0,25 М трис-HCl pH 7,8; 5 мМ дитиотрейтоле.

2. Готовят реакционную смесь следующего состава:

10—150 мкл клеточного лизата

1 мкл раствора: 60 мМ Na_2HPO_4 ; 40 мМ NaNH_2PO_4 ; 10 мМ KCl; 1 мМ MgCl_2 ; 50 мМ β -меркаптоэтанол

0,2 мл раствора: ONPG (о-нитрофенил- β -D-галактопиранозид) 2 мг/мл в 60 мМ Na_2HPO_4 ; 40 мМ NaNH_2PO_4

3. Инкубируют пробу при 37 °C до появления желтой окраски.

4. Останавливают реакцию, добавляя 0,5 мл 1 М Na_2CO_3 , и оценивают интенсивность окрашивания спектрофотометрически при 420 нм.

Следует помнить, что клетки млекопитающих содержат эукариотический изотим β -галактозидазы. Поэтому в качестве контроля необходимо включить в эксперимент лизат, полученный из интактных клеток.

7.3. Определение эффективности трансфекции по реакции с антителами

Итак, эффективность трансфекции можно оценить, определяя косвенным образом транскрипционную активность маркерного гена. В дополнение к этому можно определить реальное число клеток, экспрессирующих чужеродную ДНК по реакции с антителами к кодируемому плазмидой антигену.

Этот методический прием, хотя и не позволяет количественно оценивать эффект, обеспечивает большую свободу действий, поскольку в качестве маркера трансфекции здесь можно использовать любой белок, который в норме не экспрессируется в реципиентной клетке (конечно, при условии, что имеются в распоряжении соответствующие антитела). Помимо двух бактериальных генов, о которых мы уже рассказали, широко используются такие маркеры, как β -глобин и различные вирусные антигены. Метод иммунодетекции, основанный на использовании антител, конъюгированных с пероксидазой, оказался более простым в постановке и в то же время более чувствительным, чем реакции с флуоресцентными антителами. Ниже мы приводим описание соответствующей экспериментальной процедуры, которая, однако, при желании может быть адаптирована для «флуоресцентной» методики.

Непрямое иммунологическое выявление трансформированных клеток проводят следующим образом:

1. Клетки можно выращивать на чашках любого размера, однако наиболее удобны 35-мм чашки или 6-луночные планшеты.

2. Зафиксируйте клетки свежеприготовленной смесью равных объемов метанола и ацетона (инкубация 2 мин) и промойте PBS.

3. Определите требуемое разведение антител. Для этого придется построить калибровочную кривую. В большинстве случаев надосадочную жидкость из гибридной культуры используют неразведенной или разводят в 10 раз. Для асцитных жидкостей фактор разведения обычно составляет от 100 до 5000. Разведения антител на этой и всех последующих стадиях приготавливают в растворе, содержащем 10% фетальной телячьей сыворотки и 1% бычьего сывороточного альбумина в стерильном PBS.

4. На 35-мм чашку налейте 1 мл раствора первых антител и инкубируйте при комнатной температуре в течение 2—3 ч.

5. Удалите раствор антител и промойте клетки в четырех сменах PBS.

6. Залейте клетки раствором антител, конъюгированных с пероксидазой. Вероятно, здесь также придется предварительно провести калибровку, чтобы определить нужное разведение вто-



Рис. 4. Окрашивание клеток пероксидазой. С помощью кальций-фосфатного метода проводили трансформацию клеток CV-1 плазмидой pSV2cat; клетки инкубировали с моноклональными антителами к CAT, а затем — со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой.

рых антител. Ожидаемый фактор разведения — от 50 до 1000. Продолжительность инкубации со вторыми антителами может варьировать от 1 ч при комнатной температуре до 16 ч при 4°C.

7. Удалите раствор антител и промойте клетки, как описано в п. 5.

8. Теперь добавьте субстрат для пероксидазы. Наилучшие результаты были достигнуты с О-дианзидином (Sigma), который дает очень низкий фон. Чтобы приготовить субстратный раствор, сначала растворите О-дианзидин в абсолютном этаноле до насыщения. После того как раствор отстоится, добавьте 1 мл его к 99 мл PBS и затем туда же внесите 10 мкл перекиси водорода (разведение 1:10 000). Небольшое количество субстрата (1 мл) можно проверить, смешав его с 1 мкл конъюгата антител с пероксидазой: должна появиться темная коричнево-пурпурная окраска. Добавьте субстратный раствор к клеткам и выдержите 1 ч при комнатной температуре, чтобы цветная реакция прошла достаточно полно. Тщательно промойте чашку дистиллированной водой и поместите под покровное стекло. Препарат имеет устойчивую окраску (рис. 4).

Для получения флуоресцентно окрашенных препаратов пункты 1—5 описанной выше методики выполняют без изменений. Затем вместо меченных пероксидазой антител добавляют флуоресцентно меченные вторые антитела. Напомним, что эта методика требует наличия флуоресцентного микроскопа. Кроме того, флуоресцентные препараты недолговечны, так как флуоресценция быстро затухает. В целом же данный метод дает вполне удовлетворительные результаты (рис. 5).

Итак, оценить, какая из процедур трансфекции предпочтительнее для данной линии клеток, можно, определяя энзиматическую активность маркерного белка после трансфекции или же подсчитывая долю трансформированных клеток в популяции. Следующая задача — выбрать наиболее подходящую для конкретных условий векторную систему. Целесообразно опробовать несколько разных векторов в сочетании с различными вариантами основной методики трансфекции. Время, затраченное на этом этапе на тщательный анализ и оптимизацию экспериментальных условий, сохранит в будущем гораздо больше времени и сил при проведении продолжительных и трудоемких экспериментов.

8. Стабильная экспрессия

В этом разделе мы рассмотрим несколько методик селекции. Это тимидинкиназная селекция, основанная на экспрессии экзогенного гена тимидинкиназы (*tk*) в мутантных клетках, утративших эндогенную активность, а также две наиболее широко распространенные методики, основанные на экспрессии доми-

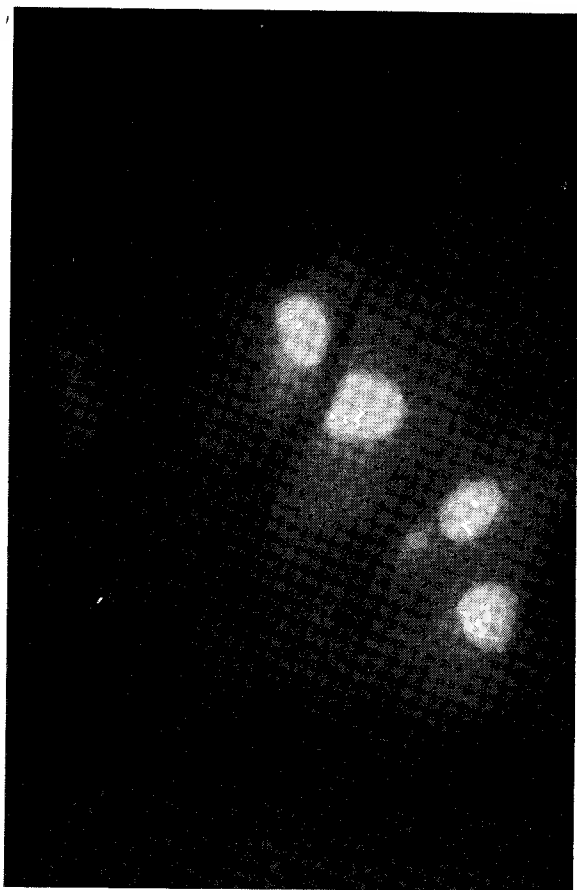


Рис. 5. Флуоресцентное окрашивание клеток. С помощью кальций-фосфатного метода проводили трансформацию клеток CV-1 плазмидой pRSVcat; клетки обрабатывали бутиратом, инкубировали с поликлональными антителами к CAT, а затем со вторыми антителами, конъюгированными с роданином.

нантных селективных маркеров — генов *E. coli gpt* и *neo^R*. Использование доминантного маркера подразумевает, что реципиентные клетки обязательно должны быть генетически маркированы, поэтому две последние системы отличаются универсальностью. Описанные выше эксперименты по временной экспрессии могут дать ответ на вопрос, какой контролирующий элемент стоит ввести в состав вектора для экспрессии в данном типе клеток. В общем виде стабильная трансформация предполагает субкультивирование клеток в селективной среде через два дня после трансфекции. Клетки высевают на подходящую селективную среду при плотности $5 \cdot 10^4$ клеток на 10-см чашку.

Среду меняют раз в 4—5 дней, пока клетки на контрольной чашке (в которые не была введена ДНК) не погибнут в селективных условиях. На экспериментальных чашках (трансформированные клетки) появляются отдельные устойчивые колонии.

8.1. Тимидинкиназная селекция

Эту методику можно использовать только для клеток, дефектных по экспрессии тимидинкиназы (ТК) [22]. Такие мутантные клетки, помещенные на специальную селективную среду, погибают. У них отсутствует функционально-активный фермент ТК, катализирующий превращение тимидина в инозинмонофосфат (ИМР); селективная же среда содержит аминоптерин, ингибирующий превращение в ИМР других предшественников. Ген *tk* в составе плазмиды спасает эти клетки от гибели, реализуя для них тимидиновый путь получения ИМР. Таким образом, на среде с аминоптерином, содержащей также тимидин и гипоксантин, выживают только те мутантные клетки, которые экспрессируют экзогенную ТК. Селективную среду часто называют НАТ-средой. Она содержит 10^{-4} М гипоксантин, $2 \cdot 10^{-5}$ М аминоптерин и 10^{-4} М тимидин. Ниже указаны концентрированные растворы, которые легко разводятся до нужной концентрации при добавлении к DMEM.

- 1) 10^{-2} М раствор гипоксантина разводится в 100 раз.
- 2) 10^{-3} М раствор аминоптерина разводится в 50 раз.
- 3) 0,04 М раствор тимидина разводится в 400 раз.

Поскольку тимидинкиназная селекция возможна только при использовании мутантных клеток, исследователь оказывается здесь «привязанным» к тому типу реципиентных клеток, который находится в его распоряжении. Чаще всего это мышинные *tk*-клетки. В этом смысле описанные ниже две другие методики, основанные на использовании доминантных селективных маркеров, представляются более универсальными.

8.2. Селекция по GPT

По своей сути доминантная селекция с использованием гена *gpt*, основанная на экспрессии бактериального фермента гипоксантин-фосфорибозилтрансферазы [23], является вариантом тимидинкиназной селекции. Здесь также блокируются аминоптерином метаболические пути, приводящие к ИМР. Микофеноловая кислота — ингибитор ИМР-дегидрогеназы блокирует образование гуанозинмонофосфата. Присутствие в среде этих двух ингибиторов делает недостаточным добавление одного только

гипоксантина. Обходной путь можно реализовать лишь при одновременном добавлении гуанина и гипоксантина. Если же клетки способны превращать ксантин в гуанин, достаточно присутствие его в среде вместо гуанина. На этом и основана GPT-селекция. Клетки млекопитающих не располагают ферментами, способными осуществлять такое превращение. Поэтому на селективной среде, содержащей ксантин, выживают только те клетки, которые экспрессируют бактериальный ген *gpt*. Продукт этого гена катализирует превращение экзогенного ксантина в гуанин. Векторы-прототипы для такой селекции — pSV2gpt [18] и pRSVgpt [4]. Метод хорошо работает на клетках NIH3T3, клетках крысы, клетках почки обезьяны CV1 и клетках CHO. Приготовление селективной среды описано в табл. 4.

Таблица 4. Среда для gpt-селекции

А. Растворы

1. Ксантин растворяют в 0,1 М NaOH в концентрации 5 мг/мл; pH раствора доводят до 10,5 HCl, стерилизуют раствор фильтрованием и хранят при комнатной температуре.
2. Раствор гипоксантина готовят следующим образом. 136 мг гипоксантина растворяют в 80 мл воды; добавляют 5 мл 0,1 М NaOH, pH раствора доводят до 9,5, добавляют воды до 100 мл; стерилизуют фильтрованием и хранят при комнатной температуре. Гипоксантин растворяется с трудом, поэтому первые 10—15 мин рекомендуется помешивать раствор.
3. Тимидин растворяют в воде в концентрации 59 мкг/100 мл; раствор стерилизуют фильтрованием и хранят при 4°C.
4. Глицин растворяют в воде в концентрации 500 мг/100 мл; раствор стерилизуют фильтрованием и хранят при 4°C.
5. Аминоптерин. 8,8 мг аминоптерина растворяют в 10 мл PBS, стерилизуют раствор фильтрованием и хранят замороженными порциями по 1 мл; раствор следует защищать от света.
6. Микофеноловая кислота. Получена от Eli Lilly по спецзаказу. Приготавливают раствор с концентрацией 25 мг/мл в абсолютном спирте (используйте стеклянную посуду).
7. Диализованная сыворотка. Диализуют 100 мл фетальной телячьей сыворотки против 2 л 0,9%-ного NaCl при 4°C в течение 2 сут. Диализный раствор меняют и снова диализуют в течение 2 сут. Цикл повторяют еще дважды и стерилизуют сыворотку фильтрованием под давлением.

Б. Селективная среда

Среду готовят непосредственно перед использованием из описанных выше запасных растворов.

Для приготовления 100 мл среды следует взять:

DMEM (с антибиотиками, см. разд. 4)	80 мл
Диализованную сыворотку	10 мл
Раствор ксантина	5 мл
Глицин	0,2 мл
Гипоксантин	1 мл
Тимидин	2 мл
Аминоптерин	0,225 мл
Микофеноловую кислоту	0,1 мл

8.3. Селекция по устойчивости к неомицину

Метод предполагает отбор клеток, приобретающих устойчивость к антибиотику. Неомицин — это бактериальный антибиотик, инактивирующий прокариотические рибосомы. Клетки млекопитающих невосприимчивы к неомицину или канамицину, однако известны аналоги этих агентов, которые подавляют деятельность эукариотических рибосом, один из таких препаратов, G418, выпускается фирмой Gibco под торговым названием Geneticin. Ген *neo^R* кодирует фосфотрансферазу, которая инактивирует G418. Следовательно, клетки, экспрессирующие этот бактериальный маркер лекарственной устойчивости под контролем эукариотического промотора, сохраняют жизнеспособность на селективной среде. Неомициновую селекцию можно проводить практически на любом типе клеток; векторы-прототипы — pSV2neo [24], pRSVneo [4].

Geneticin (Gibco) добавляют в культуральную среду в концентрации, подобранной эмпирически. Необходимо провести титрование, чтобы определить количество препарата, вызывающее гибель нетрансформированных клеток. Препарат хранят в виде раствора в концентрации 100 мг/мл. Опробуйте рабочие концентрации в интервале от 200 мкг/мл до 1 мг/мл. Селекция может оказаться «смазанной», если в среде слишком мало антибиотика или же если клетки были посеяны при слишком высокой плотности. В идеале контрольные клетки погибают в течение недели, а устойчивые колонии формируются через 10—14 дней.

9. Прямой перенос хромосомных генов

В настоящей главе мы сосредоточили внимание на экспериментах по генетическому переносу с использованием плазмидных векторов.

В частности, были освещены вопросы, связанные с применением этих векторов при подборе оптимальной методики трансфекции для конкретного типа клеток в экспериментах, направленных на изучение закономерностей экспрессии генов. Между тем в тени остался еще один аспект проблемы генетического переноса, а именно непосредственный перенос хромосомных генов из одной клетки в другую. Число реципиентных клеток, в геном которых интегрировалась донорная клеточная ДНК, очень невелико. Поэтому необходимо иметь в распоряжении методику, которая обеспечила бы селекцию этих клеток. Для выделения клонов клеток, акцептировавших чужеродную клеточную ДНК, используют два методических подхода. Первый основан на селекции конкретного фенотипа, определяемого перенесенным геном. Для подобного эксперимента необходимы реципиентные клетки,

не экспрессирующие функциональную активность, определяемую донорной ДНК. Примером такого рода эксперимента может служить работа Лови с сотр. [26]. Эти авторы в качестве реципиентов использовали клетки мутантов, утративших аденин-фосфорибозилтрансферазную активность (APRT). Донорной ДНК служила клеточная ДНК из нормальных клеток. Клоны отбирали по способности расти на НАТ-среде. На этой среде выживают только те клетки, которые имеют функционально активный ген *aprt*. Следовательно, отобранные клоны клеток приобрели данный ген из пула генов донорной клеточной ДНК. Эффективность трансфекции составляла 10^{-4} . Это означает, что из каждых 10 000 клеток, приведенных в контакт с донорной ДНК, только одна клетка приобрела ген *aprt* и оказывалась жизнеспособной в условиях проводимой селекции. Ограничением метода следует считать то, что клонируемый ген обязательно должен экспрессировать некий примечательный фенотип, для которого можно было бы подобрать соответствующие условия селекции. Кроме того, необходимо иметь реципиентные клетки, не экспрессирующие функциональную активность, определяемую интересующим геном.

Если этот ген не кодирует селективный фенотип, целесообразно использовать методику котрансфекции [26]. Котрансфекция предполагает использование селективного плазмидного

Таблица 5. Получение клеточной ДНК для трансфекции

1. Приготовьте достаточное число чашек, чтобы получить приблизительно 10^8 клеток. Ориентировочно это четыре 75 см² флакона или восемь 130 мм чашек.
2. Промойте клетки PBS три раза.
3. Добавьте к клеткам 5 мл раствора протеиназы K¹⁾. Объедините клетки с чашек или флаконов и поместите их в пробирку на 50 мл. Инкубируйте при 47°C в течение 6 ч.
4. Экстрагируйте раствор дважды 10 мл фенола. Используйте только свежеперегнаный фенол, забуференный 50 мл трис-HCl pH 7,5.
5. Диализуйте водную фазу против 4 л TEN²⁾ в течение 24 ч. Диализ надо поставить таким образом, чтобы объем диализуемого раствора увеличился в три раза. Повторите эту процедуру.
6. Подготовьте раствор ДНК к центрифугированию в градиенте плотности CsCl: добавьте CsCl из расчета 1,058 г на 1 мл раствора ДНК и, кроме того, 0,84 мл раствора этидиумбромид (10 мг/мл).
7. Центрифугируйте при 34 000 об/мин в течение 72 ч в роторе Ti60 или в течение 24 ч в роторе VTi50.
8. Отберите полосу, соответствующую клеточной ДНК, руководствуясь рекомендациями, изложенными в разд. 3.2. Следует, однако, по возможности увеличить диаметр иглы для шприца, например, взять иглу № 16, чтобы избежать фрагментирования ДНК. Приготовьте ДНК для преципитации, как это описано в разд. 3.

¹⁾ 5 мг протеиназы K растворяют в смеси 23,8 мл ЭДТА pH 8,0 и 1,25 мл 10%-ного саркозила.

²⁾ TEN: 5 mM трис-HCl pH 7,5; 2,5 mM ЭДТА; 20 mM NaCl.

маркера в дополнение к донорной ДНК, что позволяет отбирать клетки с интегрированной донорной ДНК по экспрессии маркерной плазмиды. Затем отобранные клоны скринируют на функциональную активность интересующего гена. Эффективность трансфекции для плазмидного вектора может быть довольно высокой (10^{-1}), что увеличивает шансы обнаружить в одном из клонов также и специфический клеточный ген. Таким образом, оба описанных подхода можно объединить: сначала отбирать по плазмидному маркеру клоны клеток, экспрессирующих просто чужеродную ДНК, а затем проводить селекцию по экспрессии специфического фенотипа. Эксперименты по котрансфекции показали, что около 25% клонов содержат как плазмидный вектор, так и геномную ДНК [24].

Методики прямого геномного переноса не отличаются от процедур, описанных для плазмидных векторов. Качество ДНК и в этом случае остается весьма важным параметром, влияющим на эффективность трансфекции. На наш взгляд, необходимым требованиям отвечают препараты высокомолекулярной геномной ДНК, полученные по методике, описанной в табл. 5.

Литература

1. Khoury G., Gruss P. Cell, 33, 313 (1983).
2. Laimons L. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6453 (1982).
3. Gorman C. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6777 (1982).
4. Gorman C., Padmanabhan R., Howard B. Science, 221, 551 (1983).
5. Pelham H., Bienz M. EMBO J., 1, 1473 (1982).
6. Mayo K., Warren R., Palmiter R. Cell, 29, 99 (1982).
7. Hamer D., Walling M. J. J. Mol. Appl. Genet., 1, 273 (1982).
8. Karin M., Richards R. Nature, 299, 797 (1982).
9. Robins D. et al. Cell, 29, 623 (1982).
10. Lee F. et al. Nature, 294, 228 (1981).
11. Graham F., van der Eb A. Virology, 52, 456 (1973).
12. Gorman C., Howard B., Reeves R. Nucleic Acids Res., 11, 7631 (1983).
13. Luthman H., Magnusson G. Nucleic Acids Res., 11, 1295 (1983).
14. Sompayrac L., Danna K. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 12, 7575 (1981).
15. Banerji J., Olson L., Schaffner W. Cell, 33, 729 (1983).
16. Lopata M., Cleveland D., Sollinar-Webb B. Nucleic Acids Res., 12, 5707 (1984).
17. Schumperli D., Howard B., Rosenberg M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 257 (1982).
18. Mulligan R., Berg P. Science, 209, 1422 (1980).
19. Scholer H., Gruss P. Cell, 36, 403 (1984).
20. Gorman C., Moffat L., Howard B. Mol. Cell Biol., 2, 1044 (1982).
21. Hall C. et al. J. Mol. Appl. Genet., 2, 101 (1983).
22. Wigler M. et al. Cell, 11, 223 (1977).
23. Mulligan R., Berg P. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2072 (1981).
24. Southern P., Berg P. J. Mol. Appl. Genet., 1, 327 (1982).
25. Wigler M. et al. Cell, 16, 777 (1979).
26. Lowy I. et al. Cell, 22, 817 (1980).
27. Queen C., Korn L. Methods in Enzymology, 65 (1979).

Приложение 1

Нуклеотидная последовательность pSV2 cat

```

10 20 30 40 50 60
CTTTTTCAG AAGCCTAGGC CTCCAAAAA GCCTCCTCAC TACTTCTGGA ATAGCTCAGA
70 80 90 100 110 120
GGCCGAGGCG GCCTCGGCT CTGCATAAAT AAAAAAATT AGTCAGCCAT GGGCGGAGA
130 140 150 160 170 180
ATGGGCGGAA CTGGGCGGAG TTAGGGGCGG GATGGGCGGA GTTAGGGGCG GGAATATGGT
190 200 210 220 230 240
TGCTGACTAA TTGAGATGCA TGCTTTGCAT ACTTCTGCCT GCTGGGGAGC CTGGTTGCTG
250 260 270 280 290 300
ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATCTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG GACTTTCCAC
310 320 330 340 350 360
ACCTTAAGTG ACACACATTC CACAGCTGCC TCGCGCGTTT CGGTGATGAC GGTGAAAAAC
370 380 390 400 410 420
TCTGACACAT GCAGCTCCCG GAGACGGTCA CAGCTTGCTT GTAAGCGGAT GCCGGGAGCA
430 440 450 460 470 480
GACAAGCCCG TCAGGGCGCG TCAGCGGGTG TTGGCGGGTG TCGGGGCGCA GCCATGACCC
490 500 510 520 530 540
AGTCACGTAG CGATA3CGGA GTGTATCTG GCTTAACATAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT
550 560 570 580 590 600
ACTGAGAGTG CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TCGGTAAGGA GAAAAATCCG
610 620 630 640 650 660
CATCAGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC TGACTCGCTG CGCTCGGTG TCGGGCTGCG
670 680 690 700 710 720
GCGAGCGGTA TCAGCTCACT CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA
730 740 750 760 770 780
CGCAGGAAAG AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCCG
790 800 810 820 830 840
GTTGCTGGCG TTTTTCATA GGCTCCGCCC CCCTGACGAG CATCACAAAA ATCGACGCTC
850 860 870 880 890 900
AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC CAGCGCTTTC CCCCTGGAAG
910 920 930 940 950 960
CTCCCTGCTG CGCTCTCCG TTCCGACCCT GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTTCT

```

```

970 980 990 1000 1010 1020
CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC TTTCTCAATG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTG
1030 1040 1050 1060 1070 1080
GGTCGTTGCG TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCC GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC
1090 1100 1110 1120 1130 1140
CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CAGCACTTAT CGCCACTGGC
1150 1160 1170 1180 1190 1200
AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT
1210 1220 1230 1240 1250 1260
GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG AAGGACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT
1270 1280 1290 1300 1310 1320
GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA AAAGAGTTGG TAGCTCTGA TCCGGCAAA ACACCCCGC
1330 1340 1350 1360 1370 1380
TGGTAGCGGT GGTTTTTTTT TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA
1390 1400 1410 1420 1430 1440
AGAAGATCCT TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA
1450 1460 1470 1480 1490 1500
AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCTTTT TAAATTAATA
1510 1520 1530 1540 1550 1560
ATGAAGTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAACT TGGTCTGACA GTTACCAATG
1570 1580 1590 1600 1610 1620
CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT CTGTCTATT CGTTCATCCA TAGTTGCTG
1630 1640 1650 1660 1670 1680
ACTCCCGGTC GTGTAGATAA CTACGATACG GGAGGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC
1690 1700 1710 1720 1730 1740
AATGATACCG CGAGACCCAC GCTCACCAGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC
1750 1760 1770 1780 1790 1800
CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCTGCG AACTTTATCC GCCTCCATCC AGTCTATTAA
1810 1820 1830 1840 1850 1860
TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT AGTTTGCCTA ACGTTGTTGC
1870 1880 1890 1900 1910 1920
CATTGCTGCA GGCATCGTGG TGTCACGCTC GTCGTTTGGT ATGGCTTCTT TCAGCTCCGG
1930 1940 1950 1960 1970 1980
TTCCCAACGA TCAAGGCGAG TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC
1990 2000 2010 2020 2030 2040
CTTCGGTCTT CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT
2050 2060 2070 2080 2090 2100
GGCAGCACCT CATAATCTCT TTAATGTCAT GCCATCCGTA AGATGCTTTT CTGTGACTGG
2110 2120 2130 2140 2150 2160
TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG CGACCGAGTT GCTCTTGCCC
2170 2180 2190 2200 2210 2220
GGCGTCAACA CGGGATAATA CCGCGCCACA TAGCAGAACT TTAAGAGTGC TCATCATTGG
2230 2240 2250 2260 2270 2280
AAAACGTTCT TCGGGGCGAA AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCCAT
2290 2300 2310 2320 2330 2340
GTAACCCACT CGTGACCCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTCACCA GCGTTTCTGG
2350 2360 2370 2380 2390 2400
GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA CACGGAATG
2410 2420 2430 2440 2450 2460
TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC ATTTATCAGG GTTATTGTCT

```

2470 2480 2490 2500 2510 2520
 CATGAGCGGA TACATATTG AATGTATTTA GAAAAATAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC
 2530 2540 2550 2560 2570 2580
 ATTTCCCGGA AAAGTGCCAC CTGACGTCTA AGAAACCAAT ATTATCATGA CATTAAACCTA
 2590 2600 2610 2620 2630 2640
 TAAAAATAGG CGTATCACGA GGGCCCTTCG TCTTCAAGAA TTCTTTTGCC TAATTTAAAT
 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 GAGGACTTAA CCTGTGGAAA TATTTTGATG TGGGAAGCTG TTAAGTTTAA AACTGAGGTT
 2710 2720 2730 2740 2750 2760
 ATTGGGGTAA CTGCTATGTT AAAGTTGCAT TCAGGGGACAC AAAAAACTCA TGAAAAATGGT
 2770 2780 2790 2800 2810 2820
 GCTGGAAAAAC CCATTCAAGG GTCAAATTTT CATTTTTTTG CTGTTGGTGG GGAACCTTTG
 2830 2840 2850 2860 2870 2880
 GAGCTGCAGG GTGTGTAGC AAAGTACAGG ACCAAATATC CTGCTCAAAC TGTAACCCCA
 2890 2900 2910 2920 2930 2940
 AAAAATGCTA CAGTTGACAG TCAGCAGATG AACACTGACC ACAAGGCTGT TTTGGATAAG
 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 GATAATGCTT ATCCAGTGGA GTGCTGGGTT CCTGATCCAA GTAAAAATGA AAACACTAGA
 3010 3020 3030 3040 3050 3060
 TATTTTGGA CCAACACAGG TGGGGAAAAA GTGCTCTCTG TTTTGACAT TACTAACACA
 3070 3080 3090 3100 3110 3120
 GCAACCACAG TGCTTCTTGA TGAGCAGGGT GTTGGGCCCT TGTGCAAGGC TGACAGCTTG
 3130 3140 3150 3160 3170 3180
 TATGTTTCTG CTGTTGACAT TTGTGGGCTG TTTACCAACA CTCTGGAAC ACAGCAGTGG
 3190 3200 3210 3220 3230 3240
 AAGGGACTTC CCAGATATTT TAAATTTACC CTTAGAAAGC GGTCTGTGAA AAACCCCTAC
 3250 3260 3270 3280 3290 3300
 CCAATTTCTT TTTTGTAAAG TGACCTAATT AACAGGAGGA CACAGAGGGT GGATGGGCGA
 3310 3320 3330 3340 3350 3360
 CCTATGATTG GAATGTCTTC TCAAGTAGAG GAGGTTAGGG TTTATGAGGA CACAGAGGAG
 3370 3380 3390 3400 3410 3420
 CTTCTGGGG ATCCAGACAT GATAAGATAC ATTGATGAGT TTGGACAAC CACAACCTAGA
 3430 3440 3450 3460 3470 3480
 ATGCAGTGAA AAAAAATGCTT TATTTGTGAA ATTTGTGATG CTATTGCTTT ATTTGTAAAC
 3490 3500 3510 3520 3530 3540
 ATTATAAGCT GCAATAAACA AGTTAACAAC AACAATTGCA TTCATTTTAT GTTTCAGGTT
 3550 3560 3570 3580 3590 3600
 CAGGGGGAGG TGTGGGAGGT TTTTAAAGC AAGTAAACCC TCTACAAATG TGSTATGCT
 3610 3620 3630 3640 3650 3660
 GATTATGATC TCTAGTCAAG GCACTATACA TCAAAATATC CTTATTAACC CCTTTACAAA
 3670 3680 3690 3700 3710 3720
 TTAATAAGCT AAAGGTACAC AATTTTGTAG CATAGTTATT AATAGCAGAC ACTCTATGCC
 3730 3740 3750 3760 3770 3780
 TGTGTGGAGT AAGAAAAAAC AGTATGTTAT GATTATAACT GTTATGCCCTA CTTATAAAGG
 3790 3800 3810 3820 3830 3840
 TTACAGAATA TTTTCCATA ATTTCTTGT ATAGCAGTGC AGCTTTTTC TTTGTGGTGT
 3850 3860 3870 3880 3890 3900
 AAATAGCAAA GCAAGCAAGA GTTCTATTAC TAAACACAGC ATGACTCAAA AAAGTTAGCA
 3910 3920 3930 3940 3950 3960
 ATTCTGAAGG AAAGTCCCTG GGGCTTCTA CTTTCTCTT CTTTCTTGA GGAGTAGAAT

3970 3980 3990 4000 4010 4020
 GTTGAGAGTC ACCAGTAGCC TCATCATCAC TAGATGGCAT TCTTCTGAG CAAAAAGGT
 4030 4040 4050 4060 4070 4080
 TTTCTCATC AAAGGCATTG CACCACTGCT CCCATTTCAT AGTTCCATAG GTTGGAAATG
 4090 4100 4110 4120 4130 4140
 AAAATACACA AACAATTAGA ATCAGTAGTT TAACACATTA TACACTTAAA AATTTTATAT
 4150 4160 4170 4180 4190 4200
 TTAGCTTAGA CTTTAAATC TCTGTAGGTA GTTTGTCCAA TTAATGTACA CCACAGAAGT
 4210 4220 4230 4240 4250 4260
 AAGGTTCCT CACAAGATC CCGCGAATTG CTGCCATICA TCCGCTTATT ATCACTTATT
 4270 4280 4290 4300 4310 4320
 CAGGCGTAGC ACCAGGCGTT TAAGGGCACC AATAACTGCC TAAAAAAAT TACGCCCGCG
 4330 4340 4350 4360 4370 4380
 CCGGCCACTC ATCGCAGTAC TGTGTAAAT CATTAAGCAT TCTGCCGACA TGAAGCCAT
 4390 4400 4410 4420 4430 4440
 CATAGACGGC ATGATGAACC TGAATGCCA GCGGCATCAG CACCTTGCG CCTTGGTAT
 4450 4460 4470 4480 4490 4500
 AATATTCGCC CATGGTGAAA ACGGGGGCGA AGAAGTTGTC CATATGGCC ACGTTTAAAT
 4510 4520 4530 4540 4550 4560
 CAAAAATCTT AAGCTTACT CAGGGATGG CTGAGACCA AACAATATC TCAATAAACC
 4570 4580 4590 4600 4610 4620
 CTTTAGGGA ATAGGCCATG TTTTACCGT AACACGCCAC ATCTTGCAA TATATGTGTA
 4630 4640 4650 4660 4670 4680
 AAAAACTG GAAATCTCT TGGTATTCAC TCCAGAGCGA TGAAGAGCTT TCAGTTTGGT
 4690 4700 4710 4720 4730 4740
 CATGGAAAT GGTGTAACA GGTGAACAC TATCCATAT CACCACTICA CCGTCTTICA
 4750 4760 4770 4780 4790 4800
 TTGCCATAG GAATTCGCGA TCAGCATICA TCAGGCGGCC AAGAAATGTA AAAAAAGCGG
 4810 4820 4830 4840 4850 4860
 GATAAACTT GTGCTTATT TCTTTACCG TCTTAAAAA GGGCGTAATA TCCAGCTGAA
 4870 4880 4890 4900 4910 4920
 CCGTCTGCTT ATAGGTACAT TGAGCAACTG ACTGAAATGC CTCAAAATGT TCTTTACGAT
 4930 4940 4950 4960 4970 4980
 GCCATTCGGA TATATCAACG GTGTATATC CAGTGATTTT TTTCTCCATT TTAGCTTCTT
 4990 5000
 TAGCTCTGTA AATCTCGCC AAG

MISSRES= C REFLECT= 1; FORM='C';
 P= A OR G, Q= C OR T, R= A OR T, S= C OR G, V= A OR C, W= G OR T

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
AAT 2 (GACGTC)	1	2543	5003 (99.9)	2543 2543
ACC 1 (GTVMAC)	1	503	5003 (99.9)	503 503

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
ACY 1 (GPCGQC)	2	2161 2543	4621 (92.4) 382 (7.6)	2543 2161 2543
AHA 3 (TTTAAA)	9	1489 1508 2200 2634 3199 3563 4153 4494 4833	1659 (33.2) 692 (13.8) 590 (11.8) 565 (11.3) 434 (8.7) 364 (7.3) 341 (6.8) 339 (6.8) 19 (0.4)	4833 1489 2200 4153 3199 2634 3563 4494 4833 1508
ALU 1 (AGCT)	25	53 324 373 392 673 899 1035 1292 1813 1913 1976 2676 2822 3108 3115 3359 3487 3667 3821 4150 4725 4854 4973 4982 5002	700 (14.3) 575 (11.5) 521 (10.4) 329 (6.6) 286 (5.7) 281 (5.6) 271 (5.4) 257 (5.1) 244 (4.9) 226 (4.5) 180 (3.6) 154 (3.1) 146 (2.9) 136 (2.7) 129 (2.6) 128 (2.6) 119 (2.4) 100 (2.0) 63 (1.3) 54 (1.1) 49 (1.0) 20 (0.4) 19 (0.4) 9 (0.2) 7 (0.1)	1976 2676 4150 4725 1292 1813 3821 4150 2822 3108 392 673 53 324 1035 1292 3115 3359 673 399 3487 3667 3821 4150 2676 2822 899 1035 4725 4854 3359 3487 4854 4973 1813 1913 1913 1976 5002 53 324 373 4982 5002 373 392 4973 4982 3108 3115
APA 1 (GGGCCC)	1	3094	5003 (99.9)	3094 3094
AVA 2 (GGACC)	3	1753 1955 2849	3917 (78.3) 864 (17.3) 222 (4.4)	2849 1753 2849 1935
AVA 3 (ATGCAT)	2	196 251	4948 (98.9) 55 (1.1)	251 196 251
AVR 2 (CCTAGG)	1	14	5003 (99.9)	14 14
BAL 1 (TGGCCA)	1	4486	5003 (99.9)	4486 4486
BAM H1 (GGATCC)	1	3369	5003 (99.9)	3369 3369

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
BBV 1 (GCTGC)	16	325 371 468 637 655 1074 1139 1142 1348 1676 1865 2042 2823 3297 3488 3219	1509 (30.2) 781 (15.6) 474 (9.5) 419 (8.4) 331 (6.6) 328 (6.6) 206 (4.1) 191 (3.8) 189 (3.8) 177 (3.5) 169 (3.4) 97 (1.9) 65 (1.3) 46 (0.9) 18 (0.4) 3 (0.1)	3819 325 2042 371 2823 468 3297 637 655 655 1074 1074 1142 1139 1348 1142 1676 1348 1865 1676 2042 1865 371 2042 1074 2823 325 3297 637 3488 1139 3219
BGL 1 (GCCNNNNNGGC)	2	62 1739	3326 (66.5) 1677 (33.5)	1739 62 62 1739
BVU 1 (GPSCQC)	1	3094	5003 (99.9)	3094 3094
DCE 1 (CTNAG)	14	55 542 1007 1416 1582 2122 2548 2693 3211 3894 4006 4145 4531 4979	683 (13.7) 540 (10.8) 518 (10.4) 487 (9.7) 465 (9.3) 448 (9.0) 426 (8.5) 409 (8.2) 386 (7.7) 166 (3.3) 145 (2.9) 139 (2.8) 112 (2.2) 79 (1.6)	3211 55 1582 542 2693 1007 55 1416 542 1582 4531 2122 2548 2548 1007 2693 4145 3211 1416 3894 2693 4006 4145 4145 4006 4531 55 4979
ECC R1 (GAATTC)	2	2618 4751	2870 (57.4) 2133 (42.6)	4751 2618 2618 4751
ECC R1* (NAATTN)	25	96 188 243 1492 1798 2053 2618 2631 2784 3203 3242 3266 3449 3513 3658 3680 3799 3899 4093 4130 4178	1249 (25.0) 565 (11.3) 419 (8.4) 405 (8.1) 348 (7.0) 306 (6.1) 255 (5.1) 194 (3.9) 183 (3.7) 153 (3.1) 145 (2.9) 119 (2.4) 100 (2.0) 92 (1.8) 82 (1.6) 64 (1.3) 55 (1.1) 48 (1.0) 47 (0.9) 39 (0.8) 39 (0.8)	243 96 2053 188 2784 243 4346 1492 4751 1798 96 2053 1492 2618 1798 2631 4093 2784 3449 3203 3658 3242 3799 3266 3899 3449 188 3513 4307 3658 3513 3680 243 3799 4178 3899 4225 4093 3242 4130 4346 4178

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT	ENDS
		4225	37 (0.7)	4093	4130
		4307	24 (0.5)	3242	3266
		4346	22 (0.4)	3658	3680
		4751	13 (0.3)	2618	2631
ECO R2 (CCTGG)	9				
		230	2471 (49.4)	893	3364
		285	908 (18.1)	3364	4272
		759	657 (13.1)	4576	230
		880	474 (9.5)	285	759
		893	248 (5.0)	4272	4520
		3364	121 (2.4)	759	880
		4272	56 (1.1)	4520	4576
		4520	55 (1.1)	230	285
		4576	13 (0.3)	880	893
FNU4H 1 (GCNGC)	25				
		68	660 (13.2)	4411	68
		325	592 (11.8)	3819	4411
		371	474 (9.5)	2823	3297
		468	457 (9.1)	2366	2823
		521	331 (6.6)	3488	3819
		637	328 (6.6)	1348	1676
		655	257 (5.1)	68	325
		658	229 (4.6)	2137	2366
		776	206 (4.1)	1142	1348
		931	191 (3.8)	3297	3488
		1074	189 (3.8)	1676	1865
		1139	155 (3.1)	776	931
		1142	150 (3.0)	1865	2015
		1348	143 (2.9)	931	1074
		1676	118 (2.4)	658	776
		1865	116 (2.3)	521	637
		2015	97 (1.9)	371	468
		2042	95 (1.9)	2042	2137
		2137	65 (1.3)	1074	1139
		2366	53 (1.1)	468	521
		2823	46 (0.9)	325	371
		3297	27 (0.5)	2015	2042
		3488	18 (0.4)	637	655
		3819	3 (0.1)	655	658
		4411	3 (0.1)	1139	1142
FOK 1 (GGATG)	8				
		150	1218 (24.3)	2073	3291
		407	1198 (23.9)	407	1605
		1605	948 (18.9)	3291	4239
		1786	519 (10.4)	4239	4758
		2073	395 (7.9)	4758	150
		3291	287 (5.7)	1786	2073
		4239	257 (5.1)	150	407
		4758	181 (3.6)	1605	1786
GDI 1 (RGGCCR)	6				
		17	3278 (65.5)	1208	4486
		745	728 (14.6)	17	745
		756	452 (9.0)	756	1208
		1208	447 (8.9)	4573	17
		4486	87 (1.7)	4486	4573
		4573	11 (0.2)	745	756
HAE 1 (RGGCCR)	6				
		17	3278 (65.5)	1208	4486
		745	728 (14.6)	17	745
		756	452 (9.0)	756	1208
		1208	447 (8.9)	4573	17
		4486	87 (1.7)	4486	4573
		4573	11 (0.2)	745	756

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT	ENDS
HAE 2 (PGCGCQ)	2				
		606	4633 (92.6)	976	606
		976	370 (7.4)	606	976
HAE 3 (GGCC)	17				
		18	1392 (27.8)	3095	4487
		61	670 (13.4)	76	746
		70	587 (11.7)	2014	2601
		76	494 (9.9)	2601	3095
		746	458 (9.2)	1209	1667
		757	434 (8.7)	775	1209
		775	267 (5.3)	1747	2014
		1209	222 (4.4)	4574	4796
		1667	180 (3.6)	4841	18
		1747	87 (1.7)	4487	4574
		2014	80 (1.6)	1667	1747
		2601	45 (0.9)	4796	4841
		3095	43 (0.9)	18	61
		4487	18 (0.4)	757	775
		4574	11 (0.2)	746	757
		4796	9 (0.2)	61	70
		4841	6 (0.1)	70	76
HGA 1 (GACGC)	4				
		438	3279 (65.5)	2162	438
		834	750 (15.0)	1412	2162
		1412	578 (11.6)	834	1412
		2162	396 (7.9)	438	834
		1483	258 (5.2)	1993	2251
		1588	237 (4.7)	3370	3607
		1929	105 (2.1)	1483	1588
		1947	78 (1.6)	1393	1471
		1993	75 (1.5)	1299	1374
		2251	46 (0.9)	1947	1993
		2268	36 (0.7)	2268	2304
		2304	18 (0.4)	1929	1947
		2974	17 (0.3)	2251	2268
		3370	12 (0.2)	1471	1483
		3607	11 (0.2)	1374	1385
		4217	8 (0.2)	1385	1393
HBO 2 (GAAGA)	11				
		611	1313 (26.2)	2611	3924
		1382	1145 (22.9)	4469	611
		1473	771 (15.4)	611	1382
		2228	755 (15.1)	1473	2228
		2306	467 (9.3)	4002	4469
		2415	196 (3.9)	2415	2611
		2611	109 (2.2)	2306	2415
		3924	91 (1.8)	1382	1473
		3937	78 (1.6)	2228	2306
		4002	65 (1.3)	3937	4002
		4469	13 (0.3)	3924	3937
MNL 1 (CCTC)	35				
		20	876 (17.5)	4024	4900
		32	611 (12.2)	1988	2599
		35	400 (8.0)	1171	1571
		59	370 (7.4)	3579	3949
		65	339 (6.8)	2695	3034
		72	267 (5.3)	904	1171
		78	262 (5.2)	359	621
		329	251 (5.0)	78	329
		359	242 (4.8)	3034	3276
		621	226 (4.5)	621	847
		847	206 (4.1)	1782	1988
		904	192 (3.8)	3355	3547
		1171	130 (2.6)	1652	1782

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
		1571	123 (2.5)	4900 20
		1652	81 (1.6)	1571 1652
		1782	57 (1.1)	847 904
		1988	54 (1.1)	2641 2695
		2599	45 (0.9)	3979 4024
		2641	42 (0.8)	2599 2641
		2695	32 (0.6)	3235 3317
		3034	30 (0.6)	329 359
		3276	30 (0.6)	3949 3979
HGI A1 (GRGCRC)	4			
		548	3259 (65.1)	2292 548
		1046	1161 (23.2)	1046 2207
		2207	493 (10.0)	548 1046
		2292	85 (1.7)	2207 2292
HGI C1 (GGQPCC)	2			
		1573	2712 (54.2)	1573 4285
		4285	2291 (45.8)	4285 1573
HGI D1 (GPCGQC)	2			
		2161	4621 (92.4)	2543 2161
		2543	322 (7.6)	2161 2543
HHA (GCGC)	14			
		333	2821 (56.4)	2515 333
		436	393 (7.9)	1360 1753
		466	337 (6.7)	1846 2183
		607	332 (6.6)	2183 2515
		640	270 (5.4)	640 910
		910	174 (3.5)	1077 1251
		977	41 (2.8)	466 607
		1077	109 (2.2)	1251 1360
		1251	103 (2.1)	333 436
		1360	100 (2.0)	977 1077
		1753	93 (1.9)	1753 1846
		1846	67 (1.3)	910 977
		2183	33 (0.7)	607 640
		2515	30 (0.6)	436 466
HIND 2 (GTQPAC)	4			
		2164	3665 (73.3)	3502 2164
		2893	729 (14.6)	2164 2893
		3133	369 (7.4)	3133 3502
		3502	240 (4.8)	2893 3133
HIND 3 (AAGCTT)	1			
		5001	5003 (99.9)	5001 5001
HINF 1 (GATC)	4			
		632	2263 (45.2)	1620 3883
		707	1233 (24.6)	4402 632
		1103	517 (10.3)	1103 1620
		1620	396 (7.9)	707 1103
		3883	303 (6.1)	4099 4402
		3966	109 (2.2)	3966 4075
		4075	83 (1.7)	3883 3966
		4099	75 (1.5)	632 707
		4402	24 (0.5)	4075 4099
HPH (GGTGA)	14			
		342	2114 (42.3)	2340 4454
		351	1125 (22.5)	351 1476
		1476	617 (12.3)	4728 342

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
		1703	396 (7.9)	1703 2099
		2099	227 (4.5)	1476 1703
		2325	226 (4.5)	2099 2325
		2340	118 (2.4)	4584 4702
		4454	68 (1.4)	4516 4584
		4508	54 (1.1)	4454 4508
		4516	18 (0.4)	4702 4720
		4584	15 (0.3)	2325 2340
		4702	9 (0.2)	342 351
		4720	8 (0.2)	4508 4516
		4728	8 (0.2)	4720 4728
HPA 1 (GTTAAC)	1			
		3502	5003 (99.9)	3502 3502
HPA 2 (CCGG)	15			
		378	2061 (41.2)	2159 4220
		412	583 (11.7)	4798 378
		939	527 (10.5)	412 939
		1086	408 (8.2)	4220 4628
		1112	404 (8.1)	1302 1706
		1302	242 (4.8)	1917 2159
		1706	190 (3.8)	1112 1302
		1740	147 (2.9)	939 1086
		1807	128 (2.6)	4628 4756
		1917	110 (2.2)	1807 1917
		2159	67 (1.3)	1740 1807
		4220	42 (0.8)	4756 4798
		4628	34 (0.7)	378 412
		4756	34 (0.7)	1706 1740
		4798	26 (0.5)	1086 1112
MBO 1 (GATC)	17			
		1299	2085 (41.7)	4217 1299
		1374	670 (13.4)	2304 2974
		1385	610 (12.2)	3607 4217
		1393	396 (7.9)	2974 3370
		1471	341 (6.8)	1588 1929
		3285	24 (0.5)	35 59
		3317	23 (0.5)	3556 3579
		3328	15 (0.3)	3331 3346
		3331	12 (0.2)	20 32
		3346	11 (0.2)	3317 3328
		3355	9 (0.2)	3276 3285
		3547	9 (0.2)	3346 3355
		3556	9 (0.2)	3547 3556
		3579	7 (0.1)	65 72
		3949	6 (0.1)	59 65
		3979	6 (0.1)	72 78
		4024	3 (0.1)	32 35
		4900	3 (0.1)	3328 3331
MST 1 (TGCGCA)	1			
		1845	5003 (99.9)	1845 1845
NCI 1 (CCSGG)	5			
		377	3222 (64.4)	2158 377
		412	699 (14.0)	412 1111
		1111	696 (13.9)	1111 1807
		1807	351 (7.0)	1807 2158
		2158	35 (0.7)	377 412
NCO 1 (CCATGG)	2			
		107	4343 (86.8)	107 4450
		4450	660 (13.2)	4450 107

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
NDE 1 (CATATG)	1	554	5003 (99.9)	554 554
PST 1 (CTGCAG)	2	1866 2824	4045 (80.9) 958 (19.1)	2824 1866 2824
PVU 1 (CGATCG)	1	1992	5003 (99.9)	1992 1992
PVU 2 (CAGCTG)	2	323 4853	4530 (90.5) 473 (9.5)	323 4853 4853 323
PSA 1 (GTAC)	5	539 2104 3675 4337 4875	1571 (31.4) 1565 (31.3) 667 (13.3) 662 (13.2) 538 (10.8)	2104 3675 539 2104 4875 539 4337 4875 4337 4875
SAU96 (GGNCC)	8	1667 1746 1763 1985 2601 2849 3094 3095	3575 (71.5) 616 (12.3) 248 (5.0) 245 (4.9) 222 (4.4) 79 (1.6) 17 (0.3) 1 (0.0)	3095 1667 1985 2601 2601 2849 2849 3094 1985 2601 1746 2601 1746 1763 3094 3095
SFA N1 (GATGC)	13	195 250 408 524 579 600 820 1872 2082 2312 3457 4414 4918	1145 (22.9) 1052 (21.0) 957 (19.1) 504 (10.1) 280 (5.6) 230 (4.6) 220 (4.4) 210 (4.2) 158 (3.2) 116 (2.3) 55 (1.1) 55 (1.1) 21 (0.4)	2312 3457 820 1872 4414 4918 4918 195 2082 2312 600 820 820 2082 2082 408 408 524 524 250 250 4414 4414 579 579 600
SPH 1 (GCATGC)	2	198 253	4948 (98.9) 55 (1.1)	253 198 198 253
STU 1 (AGGCCT)	1	17	5003 (99.9)	17 17
TAQ 1 (TCGA)	2	832 2276	3559 (71.1) 1444 (28.9)	832 2276 2276 832
THA 1 (CGCG)	8	332 334	2821 (56.4) 581 (11.6)	2514 332 778 1359

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
TTH111 I (GACNNNGTC)	1	437 778 1359 1689 2182 2514	493 (9.9) 341 (6.8) 332 (6.6) 330 (6.6) 103 (2.1) 2 (0.0)	1689 2182 437 778 2182 2514 1359 1689 334 437 332 334
XHO 2 (PGATCQ)	8	1373 1384 1470 1482 2250 2267 3369 4216	2160 (43.2) 1102 (22.0) 847 (16.9) 768 (15.4) 86 (1.7) 17 (0.3) 12 (0.2) 11 (0.2)	4216 1373 3369 1384 4216 1470 1482 2250 1384 1470 2250 2267 1470 1482 1373 1384
XMN 1 (GAANNNTTC)	1	2220	5003 (99.9)	2220 2220

THE FOLLOWING SITES DO NOT APPEAR:

ASU 2 (TTCGAA)	AVA 1 (CQCGPG)	BCL 1 (TGATCA)
BGL 2 (AGATCT)	BSSH 2 (GCGCGC)	BST E2 (GGTNACC)
BST X1 (CCANNNNNTGG)	CLA 1 (ATCGAT)	ECA 1 (GGTNACC)
ECO RV (GATATC)	KPN 1 (GGTACC)	MLU 1 (ACGCGT)
MST 2 (CCTNAGG)	NAE 1 (GCCGCG)	NAR 1 (GGCGCC)
NRU 1 (TCGCGA)	PAER7 1 (CTCGAG)	SAL 1 (GTCGAC)
SMA 1 (CCCGGG)	SST 1 (GAGCTC)	SST 2 (CCCGGG)
XBA 1 (TCTAGA)	XHO 1 (CTCGAG)	XMA 1 (CCCGGG)
XMA 3 (CGGCCG)		

Приложение 2

Нуклеотидная последовательность pRSV neo

BST E2 (GGTNACC)	BST X1 (CCANNNNNTGG)	CLA 1 (ATCGAT)
ECA 1 (GGTNACC)	ECO RV (GATATC)	KPN 1 (GGTACC)
PAER7 1 (CTCGAG)	SAL 1 (GTCGAC)	SST 1 (GAGCTC)
SST 2 (CCCGGG)	STU 1 (AGGCCT)	XBA 1 (TCTAGA)
XHO 1 (CTCGAG)		

```

      10      20      30      40      50      60
CTTGGAGGTTG CACACCAATG TGGTGAATGG TCAAATGGCG TTTATTGTAT CGAGCTAGGC

      70      80      90     100     110     120
ACTTAAATAC AATTATCTCT GCAATGCGGA ATTCAGTGGT TCGTCCAATC CATGTCAGAC

      130     140     150     160     170     180
CTGTCTGTTG CCTTCCTAAT AAGGCACGAT CGTACCACCT TACTTCCACC AATCGGCATG

      190     200     210     220     230     240
CAGGGTGCTT TTTCTCTCCT TGTAAGGCAT GTTGCTAACT CATCGTACC ATGTTGCAAG

```


250 260 270 280 290 300
 ACTACAAGTG TATTGCATAA GACTACATTT CCCCCTCCCT ATGCAAAAGC GAAACTACTA
 310 320 330 340 350 360
 TATCCTGAGG GGAAGCTCTAA CCGCGTACAA CCGAAGCCCC GCTTTTCGCC TAAACACACC
 370 380 390 400 410 420
 CTAGTCCCTC CAGATACGGG TATATCTGGC CCGTACATCG CGAAGCAGCG CAAAACGGCT
 430 440 450 460 470 480
 AACCCTAAGC AGATTCTTCA TGCAATTGTC GGTCAAGCCT TGCTTGTGTT TAGCTTAAAT
 490 500 510 520 530 540
 TTTGCTCGCG CACTACTCAG CGACCTCCAA CACACAAGCA GGGAGCAGAT ACTGGCTTAA
 550 560 570 580 590 600
 CTATGCGGCA TCAGAGCAGA TTGTAAGTGA AGTGCAACCT ATGCGGTGTG AAATACCGCA
 610 620 630 640 650 660
 CAGATGCGTA AGGAGAAAT ACCGCATCAG GCGCTCTTCC GCTTCTCGCG TCACTGACTC
 670 680 690 700 710 720
 GCTGCGCTCG GTCTGTCGGC TCGGCGGAGC GGTATCAGCT CACTCAAAGG CGGTAATACG
 730 740 750 760 770 780
 GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG TGAGCAAAAG GCCAGCAAAA
 790 800 810 820 830 840
 GGCCAGGAAC CGTAAAGAGG CCGCGTTGCT GCGCTTTTTC CATAGGCTCC GCCCCCCGTA
 850 860 870 880 890 900
 CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG
 910 920 930 940 950 960
 ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT CGTGCCTCTT CCTGTTCGGA CCCTGCCGCT
 970 980 990 1000 1010 1020
 TACCGGATAC CTGTCGCGCT TTCTCCCTTC GGGAAAGCGT GCGCTTTCTC AATGCTACAG
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 CTGTAGGTAT CTCAGTTGCG TGTAAGTCTG TCGCTCCAAG CTGGGCTGTG TGCACGAACC
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 CCCCCTTACG CCGGACCGCT GCGCTTATC CCGTAACAT CTCTTGTAGT CCAAGCCGGT
 1150 1160 1170 1180 1190 1200
 AAGACAGCAG TTATCGCCAC TGGCAGCAGC CACTGGTAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA
 1210 1220 1230 1240 1250 1260
 TGTAGGCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TACGGCTACA CTAGAAGGAC
 1270 1280 1290 1300 1310 1320
 AGTATTGGT ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAAAAGAG TTGGTAGGTC
 1330 1340 1350 1360 1370 1380
 TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CCGTGGTTTT TTTGTTTGCA AGCAGCAGAT
 1390 1400 1410 1420 1430 1440
 TACGCGCAGA AAAAAGAGAT CTCAAGAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG GGTCTGACGC
 1450 1460 1470 1480 1490 1500
 TCAAGTGAAC GAAACTCAC GTTAAGGGAT TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT
 1510 1520 1530 1540 1550 1560
 CACCTAGATC CTTTAAATTT AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA
 1570 1580 1590 1600 1610 1620
 AACTTGGTCT GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG CGATCTGTCT
 1630 1640 1650 1660 1670 1680
 ATTTGCTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCTGTAG ATAACATCGA TACGGGAGGG
 1690 1700 1710 1720 1730 1740
 CTTACCATCT GGCCCGAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC CCACGCTCAC CGGCTCCAGA
 1750 1760 1770 1780 1790 1800
 TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG GGCCGAGGCG AGAAGTGGTC CTGCAACTTT

1810 1820 1830 1840 1850 1860
 ATCCGCTCC ATCCAGTCTA TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT
 1870 1880 1890 1900 1910 1920
 TAATAGTTTG CGCAACGTTG TTGCCATTGC TGCAGGCATC GTGGTGTAC GCTCGTCGTT
 1930 1940 1950 1960 1970 1980
 TGGTATGGCT TCATTACGCT CCGGTTCCCA ACBATAAGG CGAGTTACAT GATCCCCCAT
 1990 2000 2010 2020 2030 2040
 GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GCTCCTTCGG TCCTCCGATC GTTGTGAGAA GTAAGTTGGC
 2050 2060 2070 2080 2090 2100
 CCGAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC
 2110 2120 2130 2140 2150 2160
 CGTAAGATGC TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG AATAGTGAT
 2170 2180 2190 2200 2210 2220
 GCGGCGACCG AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AACACGGGAT AATACCGGCG CACATAGCAG
 2230 2240 2250 2260 2270 2280
 AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG CGAAAACCTCT CAAGGATCTT
 2290 2300 2310 2320 2330 2340
 ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA CCAAAGTCTT CTTCAGCATC
 2350 2360 2370 2380 2390 2400
 TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAACAGGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA
 2410 2420 2430 2440 2450 2460
 GGGAAATAAGG GCGACACGGA AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTC AATATTATTG
 2470 2480 2490 2500 2510 2520
 AAGCATTTAT CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA TTTAGAAAAA
 2530 2540 2550 2560 2570 2580
 TAAACAAATA GGGGTTCCCG GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG TCTAAGAAAC
 2590 2600 2610 2620 2630 2640
 CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCGTATC ACGAGGCCCT TTCGTCTTCA
 2650 2660 2670 2680 2690 2700
 AGAATTCCTT TGCCTAATTT AAATGAGGAC TTAACCTGTG GAAATATTTT GATGTGGGAA
 2710 2720 2730 2740 2750 2760
 GCTGTTACTG TTAATACTGA GGTATTGGG GTAACCTGCTA TGTAAACTTT GCATTACGGG
 2770 2780 2790 2800 2810 2820
 ACACAAAAAA CTCATGAAAA TGGTGTGGA AAACCCATTC AAGGGTCAAA TTTTCATTTT
 2830 2840 2850 2860 2870 2880
 TTTGCTGTTG GTGGGGAACC TTTGAGCTG CAGGGTGTGT TAGCAAACTA CAGGACCAAA
 2890 2900 2910 2920 2930 2940
 TATCCTGCTC AAAGTGAAC CCAAAAAAT GCTACAGTTG ACAGTCAGCA GATGAACACT
 2950 2960 2970 2980 2990 3000
 GACCACAAGG CTGTTTTGGA TAAGGATAAT GCTTATCCAG TGGAGTGCTG GGTTCCTGAT
 3010 3020 3030 3040 3050 3060
 CCAAGTAAAA ATGAAAACAC TAGATATTTT GGAACCTACA CAGGTGGGGA AAATGTGCCT
 3070 3080 3090 3100 3110 3120
 CCTGTTTTGC AATTACTATA CACAGCAACC ACAGTGCTTC TTGATGAGCA GGGTGTGGG
 3130 3140 3150 3160 3170 3180
 CCTGTGTGCA AAGCTGACAG CTGTATGTT TCTGCTGTTG ACATTGTGCG GCTGTTTACC
 3190 3200 3210 3220 3230 3240
 AAGACTTCTG GAACACAGCA GTGGAAAGGA CTTCCAGAT ATTTTAAAT TACCCTTAGA
 3250 3260 3270 3280 3290 3300
 AAGCGTCTG TGAAGAACCC CTACCCAATT TCCTTTTGT TAAGTGACCT AATTAACAGG

3310 3320 3330 3340 3350 3360
 AGGACACAGA GGGTGGATGG GCAGCCTATG ATTGGAATGT CCTCTCAAGT AGAGGAGGTT
3370 3380 3390 3400 3410 3420
 AGGGTTTATG AGGACACAGA GGAGCTTCCT GGGGATCCAG ACATGATAAG ATACATTGAT
3430 3440 3450 3460 3470 3480
 GAGTTTGGAC AAACCACAAC TAGAATGCAG TGAATAAAT GCTTTATTTG TGAATTTGT
3490 3500 3510 3520 3530 3540
 GATGCTATTG CTTTATTTGT AACCATTTATA AGCTGCAATA AACAAGTTAA CAACAACAAT
3550 3560 3570 3580 3590 3600
 TGCATTCAAT TTATGTTTCA GGTTCAGGGG GAGGTGTGGG AGGTTTTTTA AAGCAAGTAA
3610 3620 3630 3640 3650 3660
 AACCTCTACA AATGTGGTAT GGCTGATTAT GATCTCTAGT CAAGGCACTA TACATCAAAAT
3670 3680 3690 3700 3710 3720
 ATTCCCTATT AACCCCTTTA CAAATTAATA AGCTAAAGGT ACACAATTTT TGAGCATAGT
3730 3740 3750 3760 3770 3780
 TATTAATAGC AGACACTCTA TGCCTGTGTG GAGTAAGAAA AAACAGTATG TTATGATTAT
3790 3800 3810 3820 3830 3840
 AACTGTTATG CCTACTTATA AAGGTTACAG AATATTTTTC CATAATTTTC TTGTATAGCA
3850 3860 3870 3880 3890 3900
 GTGCAGCTTT TTCCTTTGTG GTGTAAATAG CAAAGCAAGC AAGAGTTCTA TTAATAAACA
3910 3920 3930 3940 3950 3960
 CAGCATGACT CAAAAAATCT AGCAATTTCT AAGGAAAGTC CTTGGGGTCT TCTACCTTTC
3970 3980 3990 4000 4010 4020
 TCTTCTTTTT TGGAGGAGTA GAATGTTGAG AGTCAGCAGT AGCCTCATCA TCACTAGATG
4030 4040 4050 4060 4070 4080
 GCATTCTTTC TGAGCAAAAC AGGTTTTCTT CATTAAAGGC ATTCCACCAC TGCTCCCAAT
4090 4100 4110 4120 4130 4140
 CATCAGTTCC ATAGGTTGGA ATCTAAATA CACAAACAAT TAGAATCAGT AGTTTAACAC
4150 4160 4170 4180 4190 4200
 ATTATACACT TAAAAATTTT ATATTACCT TAGAGCTTTA AATCTCTGTA GGTAGTTTGT
4210 4220 4230 4240 4250 4260
 CCAATTATGT CACACCACAG AAGTAAGGTT CCTTCACAAA GATCCGGGAC CAAAGCGGCC
4270 4280 4290 4300 4310 4320
 ATCGTGCCTC CCCACTCCTG CAGTTTCGGG GCATGGATGC GCGGATAGCC GCTGCTGGTT
4330 4340 4350 4360 4370 4380
 TCCTGGATGC CGACGGATTT GCACTGCCGG TAGAACTCCG CGAGGTGCTG CAGCCTCAGG
4390 4400 4410 4420 4430 4440
 CAGCAGCTGA ACCAACTCCG GAGGGGATCG AGCCCGGGGT GGGCGAAGAA CTCCAGCATG
4450 4460 4470 4480 4490 4500
 AGATCCCGCG GCTGGAGGAT CATCCAGCCG GCGTCCCGGA AAACGATTCC GAAGCCCAAC
4510 4520 4530 4540 4550 4560
 CTTTCATAGA AGGCGGCGGT GGAATCGAAA TCTCGTGATG GCAGGTTGGG CGTCGCTTGG
4570 4580 4590 4600 4610 4620
 TCGGTCAATT CGAACCCGAG AGTCCCGCTC AGAAGAAGT GTCAAGAAGG CGATAGAAGG
4630 4640 4650 4660 4670 4680
 CGATGCGCTG CGAATCGGGA GCGGCGATAC CGTAAAGCAC GAGGAAGCGG TCAGCCCAAT
4690 4700 4710 4720 4730 4740
 CGCCGCCAAG CTCTTCAGCA ATATCACGGG TAGCCAACGC TATGTCTGTA TAGGGTCCG
4750 4760 4770 4780 4790 4800
 CCACACCAG CCGGCCACAG TCGATGAATC CAGAAAAGCG GGCATTTTCC ACCATGATAT

4810 4820 4830 4840 4850 4860
 TCGGCAAGCA GGCATCGCCA TGGGTACAGA CGAGATCCTC GCCGTCGGGC ATGCGCGCCT
4870 4880 4890 4900 4910 4920
 TGAGCTTGGC GAACAGTTCC GCTGGCGCGA GCCCTGATG CTCTTCGTCC AGATCATCCT
4930 4940 4950 4960 4970 4980
 GATCGACAAG ACCGGCTTCC ATCCGAGTAC GTGCTCGCTC GATGCGATGT TTCGCTTGGT
4990 5000 5010 5020 5030 5040
 GGTGCAATGG GCAGGTAGCC GGATCAAGCG TATGCAAGCG CCGCATGCA TCAGCCATGA
5050 5060 5070 5080 5090 5100
 TGATACTTT CTCGGCAGGA GCAAGGTGAG ATGACAGGAG ATCCTGCCCC GGCATTCCG
5110 5120 5130 5140 5150 5160
 CCAATAGCAG CCAGTCCCTT CCCGCTTCAG TGACAACGTC GAGCAGAGCT GCGCAAGGAA
5170 5180 5190 5200 5210 5220
 CGCCCGTCTG GCGCAGCCAC GATAGCCGCG CTGCTCGTC CTGCACTTCA TTCAGGGCAC
5230 5240 5250 5260 5270 5280
 CGGACAGGTC GGTCTTGACA AAAAGAACC GCGCGCCCTG CGCTGACAGC CGGAACACGG
5290 5300 5310 5320 5330 5340
 CGGCATCAGA GCAGCCGATT GTCTGTTGTG CCCAGTCATA GCGGAATAGC CTCTCCACCC
5350 5360 5370 5380 5390 5400
 AAGCGGCCGG AGAACCTGCG TGCAATCCAT CTTGTTCAAT CATGCGAAGC GATCCTCATC
5410 5420 5430 5440 5450 5460
 CTGTCTCTTG ATCAGATCTT GATCCCTGCG GCCATCAGAT CCTTGCGGCG AAGAAAGCCA
5470 5480 5490 5500 5510 5520
 TCCAGTTTAC TTTGCAAGGC TTCCCAACCT TACCAGAGGG CGCCCGAGCT GGCATTTCCG
5530 5540 5550 5560 5570 5580
 GTTCGCTTGC TGTCCATAAA ACCGCCAGT CTAGCTATCG CCATGTAAGC CCACTGCAAG
5590 5600 5610 5620 5630 5640
 CTACCTGCTT TCTCTTTGCG CTTGCGTTTT CCCTTGTCGA GATAGCCAG TAGCTGACAT
5650 5660 5670 5680 5690 5700
 TCATCCGGGG TCAGCACCGT TTCTGCGGAG TGGCTTTCTA CGTGTTCCCG TTCCTTTAGC
5710 5720 5730
 AGCCCTTGGC CCCTGAGTGC TTGCGGCAGC GTGAAG

MISSRES= 0 REFLECT= 1; FORM='C';
 P= A OR G, Q= C OR T, R= A OR T, S= C OR G, V= A OR C, W= G OR T

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
AAT 2 (GACGTC)	1	2567	5736 (99.9)	2567 2567
ACY 1 (GPCGQC)	6	2185 2567 4470 4549 5251 5499	2422 (42.2) 1903 (33.2) 702 (12.2) 382 (6.7) 248 (4.3) 79 (1.4)	5499 2185 2567 4470 4549 5251 2185 5499 5251 5499 4470 4549

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
AHA 3 (TTTAAA)	7	1513 1532 2224 2658 3223 3587 4177	3072 (53.6) 692 (12.1) 590 (10.3) 565 (9.9) 434 (7.6) 364 (6.3) 19 (0.3)	4177 1513 1532 2224 3587 4177 2658 3223 2224 2658 3223 3587 1513 1532
ALU 1 (AGCT)	26	53 472 697 923 1059 1316 1837 1937 2000 2700 2846 3132 3139 3383 3511 3691 3845 4174 4385 4689 5147 5507 5553 5579 5632 5733	700 (12.2) 521 (9.1) 458 (8.0) 419 (7.3) 360 (6.3) 329 (5.7) 304 (5.3) 286 (5.0) 257 (4.5) 244 (4.3) 226 (3.9) 225 (3.9) 211 (3.7) 180 (3.1) 154 (2.7) 146 (2.5) 136 (2.4) 128 (2.2) 103 (1.8) 100 (1.7) 63 (1.1) 54 (0.9) 53 (0.9) 46 (0.8) 26 (0.5) 7 (0.1)	2000 2700 1316 1837 4689 5147 53 472 5147 5507 3845 4174 4385 4689 2846 3132 1059 1316 3139 3383 697 923 472 697 4174 4385 3511 3691 3845 4174 2700 2846 923 1059 3383 3511 5632 5735 1837 1937 1937 2000 5735 53 5579 5632 5507 5553 5553 5579 5579 5632 3132 3139
APA 1 (GGGCCC)	1	3118	5736 (99.9)	3118 3118
ASU 2 (TTCGAA)	1	4569	5736 (99.9)	4569 4569
AVA 1 (CQC6PG)	1	4413	5736 (99.9)	4413 4413
AVA 2 (GGACC)	5	1787 2009 2873 4247 4735	2788 (48.6) 1374 (24.0) 864 (15.1) 488 (8.5) 222 (3.9)	4735 1787 2873 4247 2009 2873 4247 4735 1787 2009
BAL 1 (TGGCCA)	1	5170	5736 (99.9)	5170 5170
BAM H1 (GGATCC)	1	3393	5736 (99.9)	3393 3393
BBV 1 (GCTGCT)	25	405 661 679	781 (13.6) 474 (8.3) 468 (8.2)	2066 2847 2847 3321 3843 4311

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
		1098 1163 1166 1372 1700 1889 2066 2847 3321 3512 3843 4311 4380 4383 4627 5014 5107 5148 5190 5291 5699 5726	419 (7.3) 415 (7.2) 408 (7.1) 387 (6.7) 331 (5.8) 328 (5.7) 256 (4.5) 244 (4.3) 206 (3.6) 191 (3.3) 189 (3.3) 177 (3.1) 101 (1.8) 93 (1.6) 69 (1.2) 65 (1.1) 42 (0.7) 41 (0.7) 27 (0.5) 18 (0.3) 3 (0.1) 3 (0.1)	679 1098 5726 405 5291 5699 4627 5014 3512 3843 1372 1700 405 661 4383 4627 1166 1372 3321 3512 1700 1889 1889 2066 5190 5291 5014 5107 4311 4380 1098 1163 5148 5190 5107 5148 5699 5726 661 679 1163 1166 4380 4383
BCL 1 (TGATCA)	1	5409	5736 (99.9)	5409 5409
BGL 1 (GCCNNNNNGGC)	1	1763	5736 (99.9)	1763 1763
BGL 2 (AGATCT)	1	5414	5736 (99.9)	5414 5414
BSSH 2 (GCGCGC)	1	4853	5736 (99.9)	4853 4853
BVU 1 (GP6CQC)	3	3118 4410 4889	3965 (69.1) 1292 (22.5) 479 (8.4)	4889 3118 3118 4410 4410 4889
DDE 1 (CTNAG)	18	305 369 425 496 566 1031 1440 1606 2146 2572 2717 3235 3918 4030 4169 4375 4588 5713	1125 (19.6) 683 (11.9) 540 (9.4) 518 (9.0) 465 (8.1) 426 (7.4) 409 (7.1) 328 (5.7) 213 (3.7) 206 (3.6) 166 (2.9) 145 (2.5) 139 (2.4) 112 (2.0) 71 (1.2) 70 (1.2) 64 (1.1) 56 (1.0)	4588 5713 3235 3918 1606 2146 2717 3235 566 1031 2146 2572 1031 1440 305 328 4588 4375 4375 4169 1440 1606 2572 2717 4030 4169 3918 4030 425 496 496 566 305 369 369 425
ECO R1 (GAATTC)	2	89 2642	3183 (55.5) 2553 (44.5)	2642 89 89 2642

# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
ECO R1* (NAATTN)	23		
	70	1311 (22.9)	4202 5513
	89	1039 (18.1)	477 1516
	443	565 (9.9)	2077 2642
	477	419 (7.3)	2808 3227
	1516	354 (6.2)	89 443
	1822	306 (5.3)	1516 1822
	2077	293 (5.1)	5513 70
	2642	255 (4.4)	1822 2077
	2655	194 (3.4)	3923 4117
	2808	183 (3.2)	3290 3473
	3227	153 (2.7)	2655 2808
	3266	145 (2.5)	3537 3682
	3290	119 (2.1)	3704 3823
	3473	100 (1.7)	3823 3923
	3537	64 (1.1)	3473 3537
	3682	48 (0.8)	4154 4202
	3704	39 (0.7)	3227 3266
	3823	37 (0.6)	4117 4154
	3923	34 (0.6)	443 477
	4117	24 (0.4)	3266 3290
	4154	22 (0.4)	3682 3704
	4202	19 (0.3)	70 89
	5513	13 (0.2)	2642 2655
ECO R2 (DSTGG)	6		
	783	2471 (43.1)	917 3388
	904	1654 (28.8)	4865 783
	917	934 (16.3)	3388 4322
	3388	543 (9.5)	4322 4865
	4322	121 (2.1)	783 904
	4865	13 (0.2)	904 917
FNH4H † (GCNGC)	45		
	405	474 (8.3)	2847 3321
	545	457 (8.0)	2390 2847
	661	415 (7.2)	5726 405
	679	412 (7.2)	3843 4255
	682	331 (5.8)	3512 3843
	800	328 (5.7)	1372 1700
	955	253 (4.4)	5446 5699
	1098	236 (4.1)	4778 5014
	1163	229 (4.0)	2161 2390
	1166	206 (3.6)	1166 1372
	1372	191 (3.3)	3321 3512
	1700	189 (3.3)	1700 1889
	1889	155 (2.7)	800 955
	2039	150 (2.6)	1889 2039
	2066	143 (2.5)	955 1098
	2161	140 (2.4)	405 545
	2390	130 (2.3)	4383 4513
	2847	118 (2.1)	682 800
	3321	116 (2.0)	545 661
	3512	114 (2.0)	4513 4627
	3843	103 (1.8)	5343 5446
	4255	96 (1.7)	4682 4778
	4308	95 (1.7)	2066 2161
	4311	90 (1.6)	5190 5280
	4380	87 (1.5)	5020 5107
	4383	69 (1.2)	4311 4380
	4513	65 (1.1)	1098 1163
	4627	53 (0.9)	4255 4308
	4641	52 (0.9)	5291 5343
	4682	41 (0.7)	4641 4682
	4778	41 (0.7)	5107 5148
	5014	37 (0.6)	5148 5185
	5017	27 (0.5)	2039 2066
	5020	24 (0.4)	5699 5723
	5107	18 (0.3)	661 679

# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
	5148	14 (0.2)	4627 4641
	5185	11 (0.2)	5280 5291
	5190	5 (0.1)	5185 5190
	5280	3 (0.1)	679 682
	5291	3 (0.1)	1163 1166
	5343	3 (0.1)	4308 4311
	5446	3 (0.1)	4380 4383
	5699	3 (0.1)	5014 5017
	5723	3 (0.1)	5017 5020
	5726	3 (0.1)	5723 5726
FOK 1 (GGATG)	12		
	1629	1723 (30.0)	5642 1629
	1810	1218 (21.2)	2097 3315
	2097	980 (17.1)	3315 4295
	3315	457 (8.0)	4940 5397
	4295	454 (7.9)	4461 4915
	4325	287 (5.0)	1810 2097
	4461	183 (3.2)	5459 5642
	4915	181 (3.2)	1629 1810
	4940	136 (2.4)	4325 4461
	5397	62 (1.1)	5397 5459
	5459	30 (0.5)	4295 4325
	5642	25 (0.4)	4915 4940
GDI 1 (RGGCCR)	4		
	769	3938 (68.7)	1232 5170
	780	1335 (23.3)	5170 769
	1232	452 (7.9)	780 1232
	5170	11 (0.2)	769 780
HAE 1 (RGGCCR)	4		
	769	3938 (68.7)	1232 5170
	780	1335 (23.3)	5170 769
	1232	452 (7.9)	780 1232
	5170	11 (0.2)	769 780
HAE 2 (PGGCGC)	4		
	630	4251 (74.1)	1000 5251
	1000	867 (15.1)	5499 630
	5251	370 (6.5)	630 1000
	5499	248 (4.3)	5251 5499
HAE 3 (GGCC)	15		
	388	1138 (19.8)	3119 4257
	770	779 (13.6)	5345 388
	781	587 (10.2)	2038 2625
	799	496 (8.6)	4257 4753
	1233	494 (8.6)	2625 3119
	1691	458 (8.0)	1233 1691
	1771	434 (7.6)	799 1233
	2038	391 (6.8)	4780 5171
	2625	382 (6.7)	388 770
	3119	267 (4.7)	1771 2038
	4257	174 (3.0)	5171 5345
	4753	80 (1.4)	1691 1771
	4780	27 (0.5)	4753 4780
	5171	18 (0.3)	781 799
	5345	11 (0.2)	770 781
HGA 1 (GACGC)	5		
	858	2285 (39.8)	2186 4471
	1436	2044 (35.6)	4550 858
	2186	750 (13.1)	1436 2186
	4471	578 (10.1)	858 1436
	4550	79 (1.4)	4471 4550

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
HGI A1 (GRGCRG)	7	8	2635 (45.9)	2316 4951
		572	1161 (20.2)	1070 2231
		1070	603 (10.5)	5141 8
		2231	564 (9.8)	8 572
		2316	498 (8.7)	572 1070
		4951	190 (3.3)	4951 5141
		5141	85 (1.5)	2231 2316

HGI C1 (GGQPCC)	4	1597	3619 (63.1)	1597 5216
		5216	1834 (32.0)	5499 1597
		5251	248 (4.3)	5251 5499
		5499	35 (0.6)	5216 5251

HGI D1 (GPCGQC)	6	2185	2422 (42.2)	5499 2185
		2567	1903 (33.2)	2567 4470
		4470	702 (12.2)	4549 5251
		4549	382 (6.7)	2185 2567
		5251	248 (4.3)	5251 5499
		5499	79 (1.4)	4470 4549

HHA 1 (GCGC)	27	408	1760 (30.7)	2539 4299
		488	436 (7.6)	5708 408
		631	393 (6.9)	1384 1777
		664	337 (5.9)	1870 2207
		934	332 (5.8)	2207 2539
		1001	270 (4.7)	664 934
		1101	266 (4.6)	4885 5151
		1275	228 (4.0)	4625 4853
		1384	176 (3.1)	4449 4625
		1777	174 (3.0)	1101 1275
		1870	169 (2.9)	5260 5429
		2207	150 (2.6)	4299 4449
		2539	143 (2.5)	488 631
		4299	110 (1.9)	5598 5708
		4449	109 (1.9)	1275 1384
		4625	100 (1.7)	1001 1101
		4853	98 (1.7)	5500 5598
		4855	93 (1.6)	1777 1870
		4885	80 (1.4)	408 488
		5151	71 (1.2)	5429 5500
		5188	67 (1.2)	934 1001
		5252	64 (1.1)	5188 5252
		5260	37 (0.6)	5151 5188
		5429	33 (0.6)	631 664
		5500	30 (0.5)	4855 4885
		5598	8 (0.1)	5252 5260
		5708	2 (0.0)	4853 4855

HIND 2 (GTQPAC)	4	2188	4398 (76.7)	3526 2188
		2917	729 (12.7)	2188 2917
		3157	369 (6.4)	3157 3526
		3526	240 (4.2)	2917 3157

HIND 3 (AAGCTT)	1	5734	5736 (99.9)	5734 5734
-----------------	---	------	-------------	-----------

HINF 1 (GANTC)	15	312	2263 (39.5)	1644 3907
		432	1282 (22.4)	4766 312
		656	517 (9.0)	1127 1644

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
		731	396 (6.9)	731 1127
		1127	362 (6.3)	4123 4485
		1644	224 (3.9)	432 656
		3907	134 (2.3)	4632 4766
		3990	120 (2.1)	312 432
		4099	109 (1.9)	3990 4099
		4123	83 (1.4)	3907 3990
		4485	75 (1.3)	656 731
		4522	58 (1.0)	4522 4580
		4580	52 (0.9)	4580 4632
		4632	37 (0.6)	4485 4522
		4766	24 (0.4)	4099 4123

HPH 1 (GGTGA)	7	22	2701 (47.1)	2364 5065
		1500	1478 (25.8)	22 1500
		1727	693 (12.1)	5065 22
		2123	396 (6.9)	1727 2123
		2349	227 (4.0)	1500 1727
		2364	226 (3.9)	2123 2349
		5065	15 (0.3)	2349 2364

HPA 1 (GTTAAC)	1	3526	5736 (99.9)	3526 3526
----------------	---	------	-------------	-----------

HPA 2 (CCGG)	24	963	2061 (35.9)	2183 4244
		1110	1054 (18.4)	5645 963
		1136	404 (7.0)	1326 1730
		1326	275 (4.8)	4476 4751
		1730	242 (4.2)	1941 2183
		1764	190 (3.3)	1136 1326
		1831	181 (3.2)	4751 4932
		1941	171 (3.0)	5347 5518
		2183	147 (2.6)	963 1110
		4244	131 (2.3)	5089 5220
		4347	127 (2.2)	5518 5645
		4414	110 (1.9)	1831 1941
		4468	103 (1.8)	4244 4347
		4476	90 (1.6)	4999 5089
		4751	77 (1.3)	5270 5347
		4932	67 (1.2)	1764 1831
		4999	67 (1.2)	4347 4414
		5089	67 (1.2)	4932 4999
		5220	54 (0.9)	4414 4468
		5248	34 (0.6)	1730 1764
		5270	28 (0.5)	5220 5248
		5347	26 (0.5)	1110 1136
		5518	22 (0.4)	5248 5270
		5645	8 (0.1)	4468 4476

MBO 1 (GATC)	31	148	1175 (20.5)	148 1323
		1323	670 (11.7)	2328 2998
		1398	610 (10.6)	3631 4241
		1409	446 (7.8)	5438 148
		1417	396 (6.9)	2998 3394
		1495	376 (6.6)	4458 4834
		1507	341 (5.9)	1612 1953
		1612	311 (5.4)	5080 5391
		1953	258 (4.5)	2017 2275
		1971	237 (4.1)	3394 3631
		2017	165 (2.9)	4241 4406
		2275	105 (1.8)	1507 1612
		2292	81 (1.4)	4921 5002
		2328	78 (1.4)	1417 1495
		2998	78 (1.4)	4834 4912
		3394	78 (1.4)	5002 5080

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
		3631	75 (1.3)	1323 1398
		4241	46 (0.8)	1971 2017
		4406	36 (0.6)	2292 2328
		4442	36 (0.6)	4406 4442
		4458	19 (0.3)	5391 5410
		4834	18 (0.3)	1953 1971
		4912	17 (0.3)	2275 2292
		4921	17 (0.3)	5421 5438
		5002	16 (0.3)	4442 4458
		5080	12 (0.2)	1495 1507
		5391	11 (0.2)	1398 1409
		5410	9 (0.2)	4912 4921
		5415	8 (0.1)	1409 1417
		5421	6 (0.1)	5415 5421
		5438	5 (0.1)	5410 5415
MBO 2 (GAAGA)	15			
		435	1313 (22.9)	2635 3948
		635	1269 (22.1)	4902 435
		1406	771 (13.4)	635 1406
		1497	755 (13.2)	1497 2252
		2252	399 (7.0)	4026 4425
		2330	210 (3.7)	4692 4902
		2439	200 (3.5)	435 635
		2635	196 (3.4)	2439 2635
		3948	167 (2.9)	4425 4592
		3961	109 (1.9)	2330 2439
		4026	100 (1.7)	4592 4692
		4425	91 (1.6)	1406 1497
		4592	78 (1.4)	2252 2330
		4692	65 (1.1)	3961 4026
		4902	13 (0.2)	3948 3961
MLU 1 (ACGCGT)	1	376	5736 (99.9)	376 376
MNL 1. (CCTC)	41			
		5	611 (10.7)	2012 2623
		274	400 (7.0)	1195 1595
		307	370 (6.5)	3603 3973
		368	357 (6.2)	4837 5194
		504	339 (5.9)	2719 3058
		645	269 (4.7)	5 274
		871	267 (4.7)	928 1195
		928	245 (4.3)	5496 5
		1195	242 (4.2)	3058 3300
		1595	226 (3.9)	645 871
		1676	219 (3.8)	4048 4267
		1806	206 (3.6)	1806 2012
		2012	206 (3.6)	4455 4661
		2623	192 (3.3)	3379 3571
		2665	176 (3.1)	4661 4837
		2719	141 (2.5)	504 645
		3058	136 (2.4)	368 504
		3300	136 (2.4)	5194 5330
		3309	130 (2.3)	1676 1806
		3341	102 (1.8)	5394 5496
		3352	95 (1.7)	4267 4362
		3355	81 (1.4)	1595 1676
		3370	64 (1.1)	5330 5394
		3379	61 (1.1)	307 368
		3571	57 (1.0)	871 928
		3580	54 (0.9)	2665 2719
		3603	54 (0.9)	4401 4455
		3973	45 (0.8)	4003 4048
		4003	42 (0.7)	2623 2665
		4048	33 (0.6)	274 307
		4267	32 (0.6)	3309 3341
		4362	30 (0.5)	3973 4003
		4374	27 (0.5)	4374 4401

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
		4401	23 (0.4)	3580 3603
		4455	15 (0.3)	3355 3370
		4661	12 (0.2)	4362 4374
		4837	11 (0.2)	3341 3352
		5194	9 (0.2)	3300 3309
		5330	9 (0.2)	3370 3379
		5394	9 (0.2)	3571 3580
		5496	3 (0.1)	3352 3355
MST 1 (TGCGCA)	2			
		1869	3281 (57.2)	1869 5150
		5150	2455 (42.8)	5150 1869
MST 2 (CCTNAGG)	2			
		304	4070 (71.0)	304 4374
		4374	1666 (29.0)	4374 304
NAE 1 (GCCGGC)	2			
		4467	5453 (95.1)	4750 4467
		4750	283 (4.9)	4467 4750
NAR 1 (GGCGCC)	2			
		5251	5488 (95.7)	5499 5251
		5499	248 (4.3)	5251 5499
NCI 1 (CCSGG)	10			
		1135	2062 (35.9)	2182 4244
		1831	1226 (21.4)	5645 1135
		2182	696 (12.1)	1135 1831
		4244	613 (10.7)	4475 5088
		4413	397 (6.9)	5248 5645
		4414	351 (6.1)	1831 2182
		4475	169 (2.9)	4244 4413
		5088	160 (2.8)	5088 5248
		5248	61 (1.1)	4414 4475
		5645	1 (0.0)	4413 4414
NCO 1 (CCATGG)	1	4818	5736 (99.9)	4818 4818
NDE 1 (CATATG)	1	578	5736 (99.9)	578 578
NRJ 1 (TCCGGA)	2			
		398	3999 (69.7)	398 4397
		4397	1737 (30.3)	4397 398
PST 1 (CTGCAG)	4			
		1890	2425 (42.3)	5201 1890
		2848	1430 (24.9)	2848 4278
		4278	958 (16.7)	1890 2848
		5201	923 (16.1)	4278 5201
PPVU 1 (CGATCG)	2			
		147	3867 (67.4)	2016 147
		2016	1869 (32.6)	147 2016
PPVU 2 (CAGCTG)	3			
		4384	4614 (80.4)	5506 4384
		5146	762 (13.3)	4384 5146
		5506	360 (6.3)	5146 5506

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
RSA 1 (GTAC)	7	152 325 393 563 2128 3699 4947	1571 (27.4) 1565 (27.3) 1243 (21.8) 941 (16.4) 173 (3.0) 170 (3.0) 68 (1.2)	2128 3699 563 2128 3699 4947 4947 152 152 325 393 563 325 393
SAU96 1 (GGNCC)	11	388 1691 1770 1787 2009 2625 2873 3118 3119 4247 4735	1389 (24.2) 1303 (22.7) 1128 (19.7) 616 (10.7) 488 (8.5) 248 (4.3) 245 (4.3) 222 (3.9) 79 (1.4) 17 (0.3) 1 (0.0)	4735 388 388 1691 3119 4247 2625 2625 2873 3118 2009 1770 1787 3118
SFA N1 (GATGC)	16	548 603 624 844 1896 2106 2336 3481 4296 4326 4622 4812 4897 4961 5028 5283	1145 (20.0) 1052 (18.3) 1001 (17.5) 815 (14.2) 296 (5.2) 255 (4.4) 230 (4.0) 220 (3.8) 210 (3.7) 190 (3.3) 85 (1.5) 67 (1.2) 64 (1.1) 55 (1.0) 30 (0.5) 21 (0.4)	2336 3481 844 1896 5283 548 3481 4296 4326 4622 5028 5283 2106 2336 624 844 1896 2106 4622 4812 4897 4961 5028 4961 548 603 4326 603 624
SMA 1 (CCCGGG)	1	4413	5736 (99.9)	4413 4413
SPH 1 (GCATGC)	2	176 4849	4673 (81.5) 1063 (18.5)	176 4849 4849 176
TAQ 1 (TCGA)	11	50 856 2300 4408 4525 4570 4761 4923 4959 4983 5139	2108 (36.8) 1444 (25.2) 806 (14.1) 647 (11.3) 191 (3.3) 162 (2.8) 156 (2.7) 117 (2.0) 45 (0.8) 36 (0.6) 24 (0.4)	2300 4408 856 2300 50 856 5139 50 4761 4923 5139 4408 4525 4570 4923 4959 4959 4983 4983 5139
THA 1 (CGCG)	16	322 377 399 487	1762 (30.7) 871 (15.2) 581 (10.1) 493 (8.6)	2538 4300 5187 322 802 1383 1713 2206

	# OF SITES	SITES	FRAGMENTS	FRAGMENT ENDS
		802 1383 1713 2206 2538 4300 4359 4398 4448 4854 4886 5187	406 (7.1) 332 (5.8) 330 (5.8) 315 (5.5) 301 (5.2) 88 (1.5) 59 (1.0) 55 (1.0) 50 (0.9) 39 (0.7) 32 (0.6) 22 (0.4)	4448 4854 2206 2538 1383 1713 487 802 4886 5187 399 487 4300 4359 322 377 4398 4448 4359 4398 4854 4886 377 399
TTH111 1 (GACNNNGTC)	1	5132	5736 (99.9)	5132 5132
XHO 2 (PGATCQ)	13	1397 1408 1494 1506 2274 2291 3393 4240 4441 4833 5079 5414 5437	1696 (29.6) 1102 (19.2) 847 (14.8) 768 (13.4) 392 (6.8) 335 (5.8) 246 (4.3) 201 (3.5) 86 (1.5) 23 (0.4) 17 (0.3) 12 (0.2) 11 (0.2)	5437 1397 2291 3393 3393 4240 1506 2274 4441 4833 5079 5414 4833 5079 4240 4441 1408 1494 5437 2274 2291 1494 1506 1397 1408
XMA 1 (CCCGGG)	1	4413	5736 (99.9)	4413 4413
XMA 3 (CGGCCG)	1	5344	5736 (99.9)	5344 5344
XMN 1 (GAANNNTTC)	1	2244	5736 (99.9)	2244 2244

THE FOLLOWING SITES DO NOT APPEAR:

ACC 1 (GTVMAC) AVA 3 (ATGCAT) AVR 2 (CCTAGG)

СОЗДАНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ КОНСТРУКЦИЙ НА ОСНОВЕ ВИРУСА ОСПОВАКЦИНЫ ДЛЯ ЭКСПРЕССИИ ЧУЖЕРОДНЫХ ГЕНОВ

Майкл Мэккетт, Джеффри Смит и Бернард Мосс

1. Введение

Изучение первичной структуры ДНК и разработка систем экспрессии генов *in vitro* существенно расширили наши знания в области структурно-функциональной организации эукариотических генов. Эти исследования, однако, не смогли помочь в решении множества вопросов, связанных с регуляцией экспрессии генов, а также с пост-транскрипционной и пост-трансляционной модификацией генных продуктов. Преодолеть возникшие методические трудности удалось с помощью рекомбинантных конструкций на основе эукариотических вирусов, позволяющих вводить интересующие гены в культивируемые эукариотические клетки. Изначально в качестве вектора широко использовали вирус SV40. Это объясняется тем, что геном его невелик (что облегчает конструирование рекомбинантных молекул *in vitro*) и достаточно хорошо изучен. Кроме SV40 векторами служили и другие небольшие вирусы, включая вирус папилломы, аденовирусы и ретровирусы. Хотя генетическое конструирование на основе крупных вирусов, таких, как вирусы герпеса или осповакцины, представляет собой более сложную задачу, преимущество таких векторов в том, что они полностью сохраняют свою инфекционность для большого разнообразия клеточных типов и обладают значительно большей емкостью для чужеродной ДНК. Дополнительным стимулом для использования вируса осповакцины служит тот факт, что его рекомбинантные формы, экспрессирующие гены, выделенные из различных патогенных агентов, могут рассматриваться как потенциальные живые вирусные вакцины.

Вирус осповакцины, который широко применялся для создания вакцины против оспы, является наиболее изученным представителем данной группы вирусов, поэтому неудивительно, что именно он выбран в качестве основы для конструирования вектора. Вирусные частицы имеют довольно сложное строение; их размер — 200×300 нм. Геном вируса осповакцины состоит из 180 т. п. н. и обладает достаточной информационной емкостью для кодирования свыше 150 полипептидов. Одной из любопытных особенностей вируса является то, что его частицы способны синтезировать функциональную мРНК, которая копируется, метилируется и полиаденилируется. Жизненный цикл вируса мо-

жет целиком проходить в цитоплазме клетки, поскольку вирусные частицы обеспечивают производство необходимых ферментов для синтеза и посттранскрипционной модификации РНК, а также для синтеза ДНК. Таким образом, вирусы оспы обладают рядом необычных биологических черт, которые следует учитывать при разработке на их основе векторов для молекулярного клонирования и экспрессии клонированных генов.

Поначалу основными техническими проблемами, с которыми пришлось столкнуться при разработке векторов для клонирования и экспрессии генов на базе вируса осповакцины, были введение ДНК в геном вируса, эффективная экспрессия чужеродных генов и селекция рекомбинантов. Большой размер вирусного генома делает задачу создания рекомбинантной конструкции *in vitro* чрезвычайно трудной для практического выполнения. Даже если бы ее и удалось решить, изолированная вирусная ДНК, по-видимому, не обладала бы инфекционностью, поскольку интактные вирусные частицы содержат ферменты, необходимые для транскрипции вирусной ДНК. Таким образом, получить инфекционный рекомбинантный вирус на основе сконструированного *in vitro* рекомбинантного генома весьма и весьма трудно. Проблему введения чужеродной ДНК в вирусный геном удалось решить, используя гомологичную рекомбинацию в инфицированных клетках между рекомбинантными плазмидами, содержащими вирусные последовательности, и геном вирусом.

Хотя для вируса осповакцины сигналы транскрипционного контроля не идентифицированы, было показано, что области, предшествующие некоторым вирусным генам, сильно обогащены АТ-парами, что является существенным отличием от усредненных эукариотических промоторных последовательностей [5]. Получается, что вирусная РНК-полимераза узнает только «свои» уникальные регуляторные последовательности, а потому эффективную экспрессию чужеродных генов в вирусе осповакцины, по-видимому, можно получить в том случае, если использовать именно эти контролирующие генетические элементы.

Рекомбинантные вирусы составляют лишь очень небольшую часть общего пула вирусных частиц; идентифицировать их можно методом гибридизации бляшек (разд. 2.4.5.). Альтернативой тотальному скринингу может служить селекция рекомбинантов. Один из возможных путей реализации этого подхода — клонирование интересующего гена внутри тимидинкиназного гена (*tk*) вируса. Для селекции ТК-рекомбинантов используют 5-бромдезоксигуанидин (BUdR). Когда первые методические трудности удалось преодолеть, сразу несколько групп исследователей сообщили о получении рекомбинантных конструкций на базе вируса осповакцины, экспрессирующих чужеродные гены [6—12].

2. Конструирование рекомбинантных вирусов

2.1. Стратегия

Мы сконструировали рекомбинантные вирусы осповакцины, экспрессирующие чужеродные гены. Существенно, что процесс создания таких вирусов включал две стадии. Сначала путем генно-инженерных манипуляций мы получили рекомбинантную плазмиду (инсерционный вектор), которая содержала гибридный ген, фланкированный вирусными последовательностями ДНК. Гибридный ген представлял собой кодирующую белок зону чужеродного гена, с которой были состыкованы область инициации транскрипции и предшествующие этой области дистальные контролирующие последовательности из генома вируса.

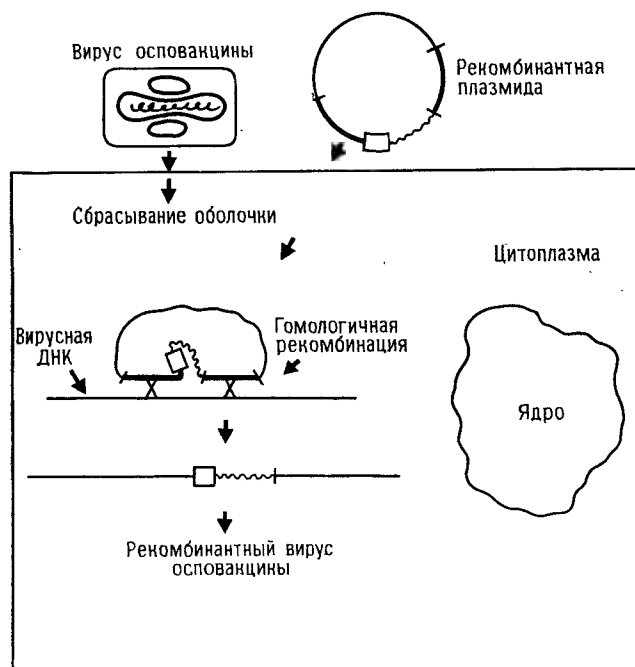


Рис. 1. Получение рекомбинантных вирусов осповакцины. Клетки, инфицированные вирусом осповакцины, трансформируют ДНК рекомбинантных плазмид. Эти конструкции содержат промотор вируса осповакцины (на рисунке обозначен белым прямоугольником), состыкованный в соответствующей ориентации с кодирующей частью чужеродного гена (волнистая линия); такой функциональный блок в составе плазмиды фланкирован последовательностями вирусной ДНК. Между фланкирующими последовательностями и вирусным геномом происходит гомологичная рекомбинация, вследствие чего чужеродный ген оказывается в составе вирусной ДНК. Рекомбинантные геномы упаковываются в вирусные частицы — формируются рекомбинантные вирусы.

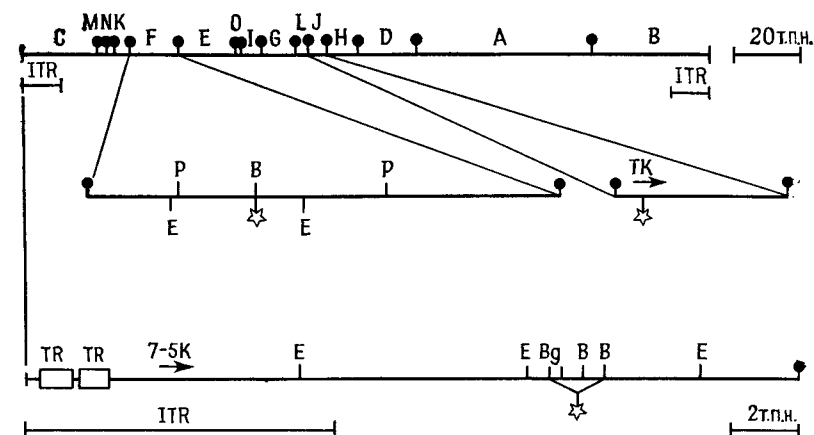


Рис. 2. Расположение участков интеграции чужеродных генов в геноме вируса осповакцины. Показаны все *HindIII*-сайты, соответствующие рестрикционные фрагменты обозначены в порядке убывания молекулярной массы. Показана также примерная локализация вирусных генов *tk* и 7,5K-белка. Детализация трех сайтов приведена в работах [6], [9] и [12]. Внизу изображен *HindIII*-фрагмент в более крупном масштабе. В таком же масштабе показаны *HindIII*- и *HindIII*-фрагменты. ITR — инвертированные концевые повторы в составе вирусной ДНК; TR — tandemные повторы; применены следующие сокращенные обозначения рестрикционных сайтов: B — *Bam*HI; E — *Eco*RI; Bg — *Bgl*II; P — *Pst*I.

Таким образом, при введении в геном вируса гибридный ген должен нормально транскрибироваться и образующаяся мРНК будет транслироваться в аутентичный чужеродный белок. Введение гибридного гена в вирусный геном удалось осуществить путем трансфекции инфицированных вирусом дикого типа клеток плазмидным инсерционным вектором. В результате гомологичной рекомбинации между вирусными последовательностями, ограничивающими гибридный ген, и вирусным геномом возник рекомбинантный вирусный геном, в состав которого вошел гибридный ген. Схема описанного эксперимента представлена на рис. 1. Последовательности вирусной ДНК, фланкирующие гибридный ген, определяют область интеграции этого гена в вирусный геном. Понятно, что чужеродный ген должен интегрироваться в участок генома, несущественный для развития вируса в культуре ткани. Ко времени написания этой главы для введения чужеродных генов были апробированы три участка вирусного генома [6, 9] (рис. 2, обозначены звездочкой). Хотя они и оказались приемлемыми для клонирования (по-видимому, в этих целях можно использовать любую несущественную область вирусного генома), мы предпочитаем вводить чужеродные гены в вирусный ген *tk*, чтобы обеспечить возможность селекции ТК⁻-рекомбинантов с помощью BUdR.

2.2. Создание плазмидных инсерционных векторов

Сейчас известны нуклеотидные последовательности нескольких генов (и их промоторных областей) вируса осповакцины [5]. Эта информация позволила разработать несколько плазмидных инсерционных векторов, которые с минимальным числом манипуляций можно использовать для клонирования и экспрессии генов в вирусе осповакцины. На рис. 3 показаны схемы трех таких векторов. Эти плазмиды содержат различные уникальные

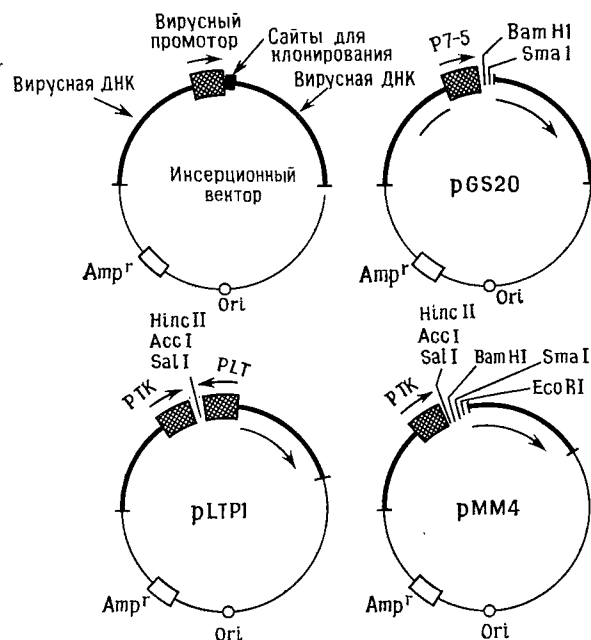


Рис. 3. Плазмидные инсерционные векторы. Обобщенная схема плазмидного инсерционного вектора показана вверху слева; pMM4, pGS20 и pLTP1 — конкретные примеры плазмидных инсерционных векторов. Отличительной чертой этих векторов является присутствие промотора вируса осповакцины, располагающегося непосредственно перед группой уникальных рестрикционных сайтов (полилинкером). Промотор и состыкованный с ним полилинкер фланкированы последовательностями вирусной ДНК, взятыми из несущественных для развития вируса областей его генома. Ген устойчивости к ампициллину (Amp^r) и бактериальная область начала репликации (ori) позволяют амплифицировать векторные плазмиды в клетках *E. coli*. Плазмида pMM4 содержит промотор гена *tk*; pGS20 — промотор раннего вирусного гена, кодирующего полипептид с молекулярной массой 7,5K; pLTP1 — промотор позднего вирусного гена, локализованного в *HindIII* — фрагменте (J. Weig, личное сообщение). На схеме показаны уникальные рестрикционные сайты для клонирования чужеродных генов под контролем вирусного промотора. Внутренние стрелки указывают локализацию и направление транскрипции вирусного гена тимидинкиназы. Внешние стрелки указывают транскрипционную ориентацию транслоцированных промоторов. Детальное описание pMM4 и pGS20 приведено в работе [12].

сайты рестрикции, расположенные группой непосредственно за вирусным промотором, который транслоцирован в центр вирусного гена *tk*. Таким образом, любая непрерывная кодирующая последовательность может быть встроена рядом с вирусным промотором. Потенциальные проблемы, связанные с нарушением рамки считывания или с синтезом составных белков, можно преодолеть, комбинируя в составе единой конструкции область инициации транскрипции вирусного промотора и иницирующий трансляцию кодон чужеродного гена. После трансфекции инфицированных вирусом дикого типа клеток инсерционным вектором, содержащим кодирующую последовательность чужеродного гена, ТК-вирусы отбирают на ТК-клетках, проводя селекцию бляшек в присутствии BUdR. Значительная часть ТК-вирусов, отобранных таким способом, представляет собой рекомбинантов, экспрессирующих чужеродный ген. Как мы уже говорили, чужеродную ДНК можно вводить и в другие несущественные области вирусного генома. Для этого необходимо, чтобы интересующий ген был фланкирован последовательностями, гомологичными этим областям. В то же время введение чужеродных генов в другие области генома не обеспечивает появления фенотипического маркера, который мог бы служить объектом селекции. Относительно несложно также, используя синтетические линкеры, вводить новые рестрикционные сайты за промоторами в уже известных инсерционных векторах. Так, с помощью синтетических линкеров в сайт *SmaI* вектора pGS20 (рис. 3) был введен новый сайт *XhoI*. Это оказалось весьма полезным для клонирования в вирусе осповакцины нескольких генов, кодирующие зоны которых выпяляются рестриктазами *XhoI* или *SalI*. Подобная стратегия конструирования, предполагающая транслокацию промотора и расположенного за ним полилинкера в «тело» гена *tk*, по-видимому, окажется эффективной и в случае использования других вирусных промоторов, когда таковые будут охарактеризованы. В связи с этим особый интерес представляют промоторы поздних структурных генов вируса. Поздние гены кодируют наиболее богато представленные вирусные белки, поэтому есть надежда получить более высокий уровень экспрессии чужеродного гена, если поставить его под контроль такого промотора.

2.3. Культивирование и очистка вируса осповакцины

Традиционно вирус осповакцины наращивали и выделяли из хориоаллантоиса 12-дневных куриных эмбрионов. В целом же большинство культивируемых клеточных линий способно обеспечить развитие этого вируса. Клетки почки обезьяны, линии BScl, CV1 и Vero широко использовали для пассирования вируса или получения его в препаративных количествах. Для полу-

чения больших количеств вируса, по-видимому, более всего подходят суспензионные культуры HeLa S3; суспензионные культуры KB также дают неплохие результаты. Монослойные культуры HeLa, MRC5, фибробласты куриных эмбрионов, RK13, ВНК и мышинные L-клетки могут использоваться для наращивания вируса.

2.3.1. Вирусные штаммы

В литературе описаны сотни штаммов вируса осповакцины. Наиболее широко известны штаммы IHD, Lister (Elstree) (вакцинный штамм), WR, Copenhagen и Wyeth (вакцинный штамм США). В последнее время большинство работ выполняются на штамме WR, хотя все перечисленные штаммы дают хороший выход вируса.

2.3.2. Определение титра

Стандартный метод для определения инфекционности вирусного препарата — метод отдельных бляшек, описанный в табл. 1. Подходящие разведения вируса инкубируют в течение нескольких дней с монослоем клеток. После окрашивания выявляются инфицированные участки монослоя, где клетки подверглись дегенерации и отслоились (бляшки). Учитывая разведение, при

Таблица 1. Определение титра вирусного препарата

1. Дайте препарату оттаять. Диспергируйте агрегировавшие обломки клеток путем обработки ультразвуком средней интенсивности (ультразвуковой дезинтегратор с водяной баней; Megasonic 80 Kc).
2. Добавьте 0,1 объема раствора трипсина (2,5 мг/мл) (Difco, Trypsin 1:250) и инкубируйте при 37°C в течение 30 мин.
3. Приготовьте серию 10-кратных разведений¹⁾ вируса в растворе Хенкса+0,1% BSA (от англ. *bovine serum albumin* — бычий сывороточный альбумин) при 25°C.
4. Удалите среду культивирования с только что сформировавшейся монослойной культуры подходящей линии клеток. В качестве клеток-хозяев для титрования можно использовать CV1, BS1, Vero или RK13. Промойте культуру один раз PBS и подсушите монослой.
5. Нанесите на клеточный монослой разведение вируса в малом объеме (0,5 на монослой, выращенный на 6 см чашке или 0,15 мл на 1,5 см² монослой, выращенный в 24-луночной планшете) и инкубируйте при 37°C в течение 1—2 ч.
6. Удалите вирусный инокулят, добавьте к клеткам подходящую среду (с учетом требований, предъявляемых данным клеточным типом), содержащую 5% фетальной телячьей сыворотки (FCS), и инкубируйте клетки при 37°C в течение 36—48 ч.

¹⁾ Чтобы снизить вероятность случайной ошибки, следует приготовить дублирующие разведения и каждое разведение титровать на нескольких монослоях; для определения титра вирусного препарата оптимальное количество бляшек на одном монослое — приблизительно 100.

котором получено данное количество бляшек, и считая, что каждая бляшка образована потомством одной инфекционной вирусной частицы, нетрудно определить титр препарата. Эту величину выражают обычно числом бляшкообразующих единиц в 1 мл (б.о.е./мл). Следует иметь в виду, что титр одного и того же препарата вируса может отличаться в 5 раз в зависимости от вида используемых для титрования клеток.

2.3.3. Получение и очистка вирусных препаратов

После того как удалось идентифицировать рекомбинантный вирус, мы обычно дважды очищаем его, рассеивая до отдельных бляшек, и лишь затем приступаем к пробному наращиванию. Процедура очистки вируса методом отдельных бляшек описана в табл. 2. Методика опирается на тот факт, что каждая вирусная бляшка образована потомством одной инфекционной вирусной частицы. Процедура получения небольших количеств вируса описана в табл. 3. Для наращивания вируса в препаративных количествах (табл. 4) рекомендуем использовать клетки HeLa, адаптированные к суспензионному культивированию.

Таблица 2. Очистка вируса методом отдельных бляшек

1. Выполните пункты 1—5 методики определения титра вирусного препарата (табл. 1).
2. Удалите вирусный инокулят и залейте монослой минимальной средой Игла (MEM), содержащей 1% агара¹⁾ и 5% фетальной сыворотки. Если необходимы какие-либо добавки для создания селективных условий, их можно ввести в агарозный слой. Инкубируйте при 37°C в течение 36—48 ч.
3. Окрасьте клетки: поверх агарозного слоя нанесите слой 1%-ной агарозы, содержащей 0,1% нейтрального красного. Инкубируйте при 37°C в течение нескольких часов, чтобы визуализировать вирусные бляшки; последние проявляются как прозрачные зоны в окрашенном монослое, поскольку только живые клетки включают нейтральный красный.
4. Отберите хорошо изолированные бляшки при помощи пастеровской пипетки с маленькой резиновой грушей. Для этого проткните агарозу точно над выбранной бляшкой до монослоя и втяните в пипетку агарозную пробку. При этом большая часть инфицированной зоны монослоя останется связанной с агарозой.
5. Перенесите этот кусочек агарозы с инфицированными клетками в 0,5 мл MEM.
6. Выделите вирусные частицы из монослоя путем трехкратного повторения цикла замораживания — оттаивания. Это удобно сделать, помещая пробирку попеременно в спиртовую баню с сухим льдом и в теплую водяную баню. Обычно одна вирусная бляшка содержит от 10⁴ до 10⁵ б.о.е.
7. Для повторной очистки вируса повторите стадии 3—5 из табл. 1 и затем стадии 2—6 настоящей методики.

¹⁾ Мы показали, что для некоторых клеточных линий, культивируемых на селективных средах, применение 1%-ной легкоплавкой агарозы дает лучшие результаты.

Таблица 3. Получение небольших количеств вируса

1. Половину общего количества вирусных частиц, полученных из индидуальной бляшки (стадия 6 табл. 2), используйте для инфицирования небольшой монослойной культуры (25 см²), только что достигшей стадии монослоя (стадия 4 и 5 табл. 1).

2. Добавьте соответствующую среду (учитывая тип клеток и при необходимости — требования селекционной процедуры), содержащую 5% FCS. Инкубируйте при 37 °C, пока вирусный цитопатический эффект не проявится у большинства клеток монослоя.

3. Соскоблите инфицированные клетки в среду и открутите на низкой скорости в настольной центрифуге.

4. Суспендируйте осадок клеток в 2 мл гипотонического буфера. Это может быть 10 mM трис-HCl pH 9; 1 mM ЭДТА или же 5 mM цитрат-фосфатный буфер pH 7,4.

5. Вскройте клетки путем трехкратного повторения цикла замораживания — оттаивания. Полученный вирусный препарат храните при -70 °C. Этот препарат при необходимости может быть использован для получения больших количеств вируса (предварительно такой препарат следует подвергнуть мягкой ультразвуковой обработке).

2.4. Методики трансфекции

После того как кодирующая белок последовательность чужеродного гена поставлена под контроль промотора вируса осповакцины и в составе рекомбинантной плазмиды фланкирована последовательностями вирусной ДНК, можно переходить к следующему этапу — введению данного гена в геном вируса путем гомологичной рекомбинации *in vivo*. Для трансфекции инфицированных вирусом осповакцины клеток CV1 используют кальций-фосфатный преципитат плазмидной ДНК аналогично тому, как это делается при работе с вирусными мутантами (метод «спасения» маркера) [13]. Трансфекцию проводят в тех же экспериментальных условиях. Мы также получали вирусные рекомбинанты путем трансфекции инфицированных первичных фибробластов куриных эмбрионов MRC5 и человеческих клеток TK-143. Процедура трансфекции описана в табл. 5. Полученный по этой методике вирусный препарат практически целиком представлен вирусом дикого типа, однако рекомбинация между диким вирусом и плазмидной конструкцией все же имеет место и позволяет получить ограниченное число рекомбинантов. В следующем разделе описана процедура выделения этих рекомбинантов.

При необходимости можно изменить некоторые параметры трансфекционной процедуры, с тем чтобы повысить эффективность рекомбинации (см. гл. 6 данного тома). В нескольких работах [14—16] сообщалось, что добавление вирусной ДНК к кальций-фосфатному преципитату увеличивает эффективность спасения маркера. Замена используемой в качестве носителя телячьей тимусной ДНК плазмидной рекомбинантной ДНК также повышает эффективность этой процедуры. Примечательно,

Таблица 4. Получение препаративных количеств вируса

А. Неочищенные препараты

1. Засейте восемь 150 см² флаконов — каждый 5·10⁷ клеток HeLa (суспензионная культура) в среде MEM. Инкубируйте в течение ночи.

2. Возьмите половину вирусного препарата, полученного по методике, изложенной в табл. 3, добавьте 0,1 объема раствора трипсина (2,5 мг/мл) и инкубируйте в течение 30 мин при 37 °C.

3. Разведите препарат до 16 мл PBS+0,1% BSA и по 2 мл внесите в каждый из флаконов. Инкубируйте при 37 °C в течение 1 ч, добавьте по 40 мл MEM+5% FCS и инкубируйте еще 48 ч.

4. Соберите клетки, для чего соскоблите их в среду и открутите на низкой скорости в настольной центрифуге. Ресуспендируйте осадок клеток в MEM, исходя из расчета 2 мл среды на один монослой (в сумме — 16 мл), и проведите 3 цикла замораживания — оттаивания для высвобождения вируса.

5. Определите титр полученного вирусного препарата (табл. 1). Обычно такие препараты имеют титр 10¹⁰ б. о. е./мл.

Б. Очищенные препараты

1. Нарастите 2—10 литров суспензионной культуры клеток HeLa S3 до плотности 5·10⁵ клеток/мл.

2. Инкубируйте необходимое количество неочищенного вирусного препарата в присутствии трипсина (0,1 объема раствора трипсина с концентрацией 2,5 мг/мл) при 37 °C в течение 30 мин. Количество вируса должно быть достаточным для заражения клеток в суспензии при множественности 5 б. о. е. на клетку.

3. Сконцентрируйте клетки до 5·10⁶ клеток/мл путем низкоскоростного центрифугирования (ресуспендируйте в среде культивирования).

4. Добавьте к сконцентрированным клеткам трипсиновый неочищенный препарат вируса и инкубируйте в суспензии при 37 °C в течение 1 ч. Разбавьте суспензию средой до концентрации 5·10⁵ клеток/мл и инкубируйте еще в течение 48 ч.

5. Соберите инфицированные клетки и ресуспендируйте в 10 mM трис-HCl pH 9,0 при 4 °C, исходя из расчета — 2 мл буфера на 2·10⁷ инфицированных клеток из монослоя или на 100 мл суспензионной культуры. Эту и все последующие процедуры выполняйте на льду.

6. Гомогенизируйте в плотно пригнанном гомогенизаторе Даунса (15—20 ходов поршня). Проконтролируйте полноту разрушения клеток под микроскопом.

7. Осадите ядра путем центрифугирования при 750 g в течение 5 мин при 4 °C. Ресуспендируйте осадок в 10 mM трис-HCl pH 9,0, снова центрифугируйте и жидкие фазы объедините.

8. Добавьте 0,1 объема трипсина (2,5 мг/мл) и инкубируйте при 37 °C в течение 30 мин с периодическим встряхиванием.

9. Наслоите этот препарат на равный объем 36% (по весу) сахарозы в 10 mM трис-HCl pH 9,0 в пробирке для ротора Beckman SW27 (1'·3,5'') или эквивалентного. Центрифугируйте при 13 500 об/мин (25 000 g) в течение 80 мин при 4 °C.

10. Удалите надосадочную жидкость и ресуспендируйте осадок (вирус и клеточные обломки) в 2 мл 1 mM трис-HCl pH 9,0. Добавьте 0,1 объема трипсина (2,5 мг/мл) и инкубируйте при 37 °C в течение 30 мин.

11. Наслоите по 2 мл суспензии вируса на градиент концентрации сахарозы (15—40% в 1 mM трис-HCl pH 9,0) в пробирках для ротора SW27 (или эквивалентного). Центрифугируйте при 12 000 об/мин (18 750 g) в течение 45 мин при 4 °C.

12. Отберите зону, содержащую вирус, с помощью шприца и иглы (проколите стенку пробирки). Разведите в 3 раза 1 mM трис-HCl pH 9,0 и осадите вирус центрифугированием при 25 000 g в течение 60 мин при 4 °C.

Продолжение

13. Ресуспендируйте вирус в 1 мМ трис-НСl pH 9,0, разделите препарат на аликвоты и храните при -70°C .

14. Определите титр вируса в одной из аликвот, пользуясь методикой, описанной в табл. 1. 5 литров клеточной суспензии обычно дают 2 мл препарата с титром $5 \cdot 10^{10}$ б. о. е./мл.

Таблица 5. Методика трансфекции для получения рекомбинантных вирусов

1. Инфицируйте только что сформировавшуюся монослойную культуру CV1 (25 см²) очищенным вирусным препаратом (множественность — 0,05 б. о. е. на клетку). Воспользуйтесь методикой, описанной в табл. 1 (стадии 1—5); на стадии 3 приготовьте требуемое разведение вируса.

2. Добавьте 1 мкг ДНК рекомбинантной плазмиды к 19 мкг ДНК тимуса теленка в 1 мл НЕРЕС-буфера (см. гл. 6 разд. 5.1).

3. Осадите ДНК, добавив хлорид кальция до концентрации 125 мМ. Оставьте при 25°C на 30 мин.

4. Через 2 ч после инфицирования клеток удалите вирусный инокулят и дважды промойте монослой средой, не содержащей сыворотки. Добавьте 0,5 мл суспензии ДНК и инкубируйте при комнатной температуре.

5. Через 30 мин добавьте 5 мл среды +5% FCS и инкубируйте при 37°C в течение еще 3,5 ч.

6. Замените среду на MEM+5% FCS.

7. По прошествии 48 ч после инфицирования соберите клетки, соскоблив их в среду. Выделите вирус путем трехкратного повторения цикла замораживания — оттаивания.

что ни глицериновый, ни диметилсульфоксидный шок не влияют на ее эффективность. Наряду с клетками CV1 мы использовали человеческие клетки TK^{-} 143. По-видимому, большинство клеточных линий, восприимчивых к вирусу осповакцины и эффективно трансфицируемых кальций-фосфатным методом, могут с успехом заменить клетки CV1.

2.5. Селекция рекомбинантов

Выбор метода отбора рекомбинантов зависит от места внедрения чужеродного гена и от природы экспрессируемого продукта этого гена.

2.5.1. Селекция TK^{+} -рекомбинантов

Первое сообщение об экспрессии чужеродного гена в вирусе осповакцины касалось гена пиридинкиназы вируса простого герпеса [6, 9]. В этом случае экспрессия клонированного гена сообщает рекомбинантному вирусу фенотип TK^{+} , что позволяет легко отличить его от исходного TK^{-} -вируса. Рекомбинантные плазмиды, использовавшиеся для создания вирусных TK^{+} -рекомбинантов, содержали кодирующую последовательность пири-

Таблица 6. Получение и селекция TK^{+} -рекомбинантов

1. Инфицируйте клетки CV1 TK^{-} -мутантом вируса осповакцины при множественности 0,05 б. о. е. на клетку (см. табл. 1 стадии 1—5; на стадии 3 приготовьте требуемое разведение вируса).

2. Через 2 ч добавьте к клеткам кальций-фосфатный преципитат ДНК рекомбинантной плазмиды (см. табл. 5). Оставьте при 25°C на 30 мин. Добавьте к клеткам среду, инкубируйте при 37°C и через 48 ч после инфицирования выделите вирус (стадии 2—7 табл. 5).

3. Полученный вирусный препарат содержит небольшое количество TK^{+} -рекомбинантов, которые можно отобрать, наращивая вирус в селективных условиях — на среде, содержащей метотрексат (аметоптерин). Высейте препарат вируса на клетки 143 TK^{-} , которые только что образовали полный монослой (стадии 1—2, табл. 2). Селективная верхняя агаризованная среда должна содержать 5% FCS, 100 мкМ незаменимых аминокислот, 15 мкМ глицина и 1 мкМ метотрексата.

4. Через 48 ч после инфицирования окрасьте клетки, чтобы визуализировать бляшки. Отберите бляшки, образованные TK^{+} -вирусом, и очистите их методом отдельных бляшек на селективной среде, как описано в табл. 2 (стадии 4—7).

мидинкиназного гена вируса простого герпеса типа 1, состыкованную с промотором гена вируса осповакцины (кодирующего полипептид размером 7,5 кДа). Этот функциональный блок фланкировали последовательности ДНК, взятые из левой концевой части генома вируса осповакцины, которая не оказывает существенного влияния на процесс развития вируса. Методика, описанная в табл. 6, может оказаться полезной при создании рекомбинантов, экспрессирующих различные гены, пристыкованные к тиминкиназному гену вируса герпеса.

Некоторое время спустя было показано, что TK^{+} -вирусы действительно содержат в геноме интегрированный ген *tk* вируса герпеса и своим TK^{+} -фенотипом обязаны эффективной экспрессии этого гена. Теоретически была обоснована возможность вводить гены в TK^{-} -вирус осповакцины в тандеме с геном тимидинкиназы. Преимуществом такого подхода является то, что все TK^{+} -вирусы должны содержать также и интересующий ген. Недостатком же его следует считать необходимость создания сложных рекомбинантных конструкций, что сопряжено с целым рядом технических трудностей. Монослойные культуры человеческих клеток 143 TK^{-} очень быстро дегенерируют в присутствии метотрексата. Сохранность монослоя повышается, если вместо агара для верхнего слоя, содержащего метотрексат, использовать легкоплавкую агарозу. Мы задались вопросом, нельзя ли найти клетки, более устойчивые к метотрексату, и с этой целью опробовали мышинные линии LMTK⁻ и ВНКТК⁻. В наших руках вирус осповакцины плохо развивался на клетках LMTK⁻, давая очень мелкие бляшки. Линия ВНКТК⁻ в этом отношении была несколько лучше, однако и эти клетки не могли сравниться с TK^{-} 143. Вот почему мы вернулись к линии TK^{-} 143 и

в дальнейшем широко использовали именно эти клетки для селекции как TK^+ , так и TK^- -рекомбинантных вирусов осповакцины (см. следующий раздел).

2.5.2. Селекция рекомбинантов, содержащих клонированный ген в составе вирусного гена TK

Альтернативный метод получения рекомбинантов предполагает внедрение клонированного гибридного гена в вирусный ген tk ; отбор рекомбинантных вирусов здесь производится по фенотипу TK^- на TK^- -клетках в присутствии BUdR. Мы сконструировали ряд инсерционных векторов (см. рис. 3), в составе которых кодирующая последовательность вирусного гена tk прерывается полилинкером с уникальными рестрикционными сайтами и состыкованным с ним вирусным промотором. Эти векторы используйте при работе по следующей схеме.

1. Получите рекомбинантные плазмиды на основе данных векторов: интересующий ген встройте в один из рестрикционных сайтов в составе полилинкера. Рекомбинантные ДНК введите путем трансфекции в инфицированные вирусом осповакцины клетки по стандартной методике, описанной в табл. 5.

2. Высейте пятую часть полученного вирусного препарата на клетки TK^- 143, как описано в табл. 2. На стадии 2 используйте 1%-ную легкоплавкую агарозу, содержащую 5% FCS, MEM и 25 мкг/мл BUdR.

3. Через 48 ч после инфицирования окрасьте клеточный монослой нейтральным красным, чтобы визуализировать бляшки, образованные TK^- -вирусом (табл. 2, стадия 3).

4. Отберите ≈ 24 хорошо изолированные бляшки и инфицируйте небольшие монослои ($1,5 \text{ см}^2$; $1-2 \cdot 10^5$ клеток) TK^- 143 в присутствии 25 мкг/мл BUdR.

Последнюю процедуру удобно проводить в 24-луночных планшетах (стадия 6, табл. 2; стадии 4 и 5, табл. 1). Присутствие фрагмента чужеродной ДНК в составе вирусного генома можно легко определить с помощью обычного ДНК-гибридизационного теста. Можно также тестировать экспрессию чужеродного гена с помощью дот-анализа с антителами (см. разд. 2.5.3 и 2.5.4).

Было показано, что два цикла очистки через отдельные бляшки обеспечивают получение гомогенного вирусного препарата. В типичном эксперименте от 20 до 90% первоначально отобранных TK^- -бляшек оказывалось рекомбинантами; остальные представители спонтанных TK^- -мутантов. Отметим, что в тех случаях, когда клонировали очень большие фрагменты ДНК, доля рекомбинантов среди TK^- -вирусов уменьшалась. По-видимому, чем крупнее фрагмент чужеродной ДНК, заключенный между фланкирующими вирусными последовательностями, тем менее эффективно протекает гомологичная рекомбинация, обеспечивающая интеграцию этого фрагмента в вирусный геном.

2.5.3. Дот-гибридизация ДНК

1. Инфицируйте клетки 143 TK^- , выращенные в $1,5 \text{ см}^2$ ячейках ($1-2 \cdot 10^5$ клеток) половиной вирусного препарата, полученного из отдельной TK^- -бляшки (предполагаемый рекомбинант, отобранный как описано в разд. 2.5.2).

2. Инкубируйте при 37°C в течение 36—48 ч. Соскоблите инфицированные клетки в среду. Для этой цели удобно использовать поршень от шприца на 1 мл.

3. Нанесите пятую часть собранного материала на нитроцеллюлозный фильтр. Для этого профильтруйте материал через ячейки прибора для нанесения дот-образцов типа «manifold», выпускаемого фирмой Schleicher and Schuell.

4. Промойте фильтр 100 mM NaCl; 50 mM трис-HCl pH 7,5.

5. Поместите фильтр на 3 мин последовательно на листы Whatman 3MM, пропитанные: а) 0,5 M NaOH; б) 1M трис-HCl pH 7,0; в) $2 \times \text{SSC}$ ($1 \times \text{SSC}$: 0,15 M NaCl; 0,015 M цитрат натрия).

6. Прогрейте фильтр в вакуумном шкафу при 80°C в течение 2 ч. После этого фильтр можно гибридизовать с радиоактивно меченой пробой (ДНК интересующего гена), воспользовавшись рекомендациями, изложенными в [22]. Гибридизация с пробами, удельная активность которых составляет 10^7 имп/мин/мкг ДНК, позволяет получить отчетливый сигнал на рентгеновской пленке при экспонировании ее в течение ночи.

7. Методом отдельных бляшек проведите очистку тех препаратов вируса, которые дали положительный сигнал при гибридизации с интересующим геном. Приготовьте препараты рекомбинантных вирусов, как описано в разд. 2.3.3 (табл. 3 и 4).

На рис. 4, А показаны результаты эксперимента по дот-гибридизационному анализу ДНК. В данном случае кДНК гликопротеина VSV (штамм New Jersey VSV NJ) была поставлена под контроль позднего промотора вируса (pLTP1, рис. 3), транслацированного в вирусный ген tk . После трансфекции инфицированных вирусом клеток плазмидной рекомбинантной ДНК TK^- -вирусы были отобраны на клетках 143 TK^- в присутствии BUdR; всего отобрали 24 бляшки. Из каждой бляшки на небольшом монослое приготовили вирусный препарат и тестировали его с помощью меченой ^{32}P кДНК VSV на присутствие ДНК VSV. Из 24 отобранных TK^- -бляшек 20 дали положительный гибридационный сигнал с ДНК VSV (см. рис. 4 А).

2.5.4. Дот-анализ с применением антител

Для выявления рекомбинантных вирусов можно использовать антисыворотку к продукту клонированного гена. На рис. 4, Б представлены результаты эксперимента по иммунодетекции, проведенного параллельно с вышеописанным экспери-

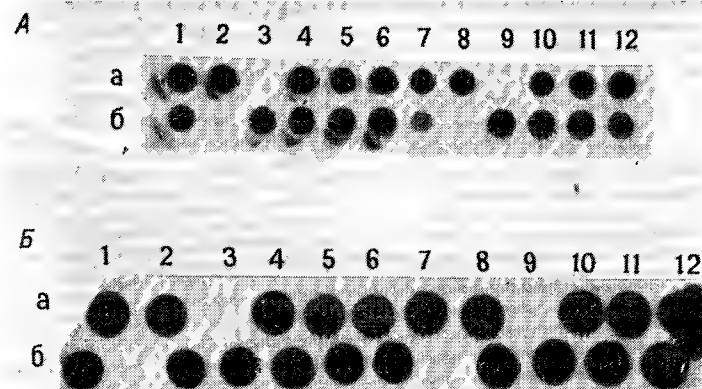


Рис. 4. А. Идентификация VSV ДНК, клонированной в составе рекомбинантного вируса осповакцины, 24 небольших монослоя, инфицированных ТК-вирусами (а 1—12, б 1—12), перенесли на нитроцеллюлозу и гибридизовали с меченой ^{32}P кДНК гликопротеина VSV (разд. 2.4.3). Результаты радиоавтографии свидетельствуют о том, что 20 из 24 монослойных культур были инфицированы вирусами, содержащими ген гликопротеина VSV. Б. Идентификация продуктов экспрессии гликопротеина VSV в рекомбинантном вирусе осповакцины, 24 небольших монослоя (а А—12, б 1—12), инфицированных параллельно с серией (А), экстрагировали NP-40, затем нанесли экстракты на нитроцеллюлозу и тестировали на присутствие гликопротеина VSV (VSVG) с помощью анти-VSVG-антител и меченого ^{125}I белка А (разд. 2.4.4). По результатам радиоавтографии 20 из 24 монослоев были инфицированы рекомбинантными вирусами, экспрессирующими VSVG. Экспозиция составляла: А—6 ч, Б—48 ч (пленка Kodak XAR5).

ментом по дот-гибридизации ДНК. Те же самые ТК-бляшки были высеяны на клетки 143 ТК-, выращенные в $1,5\text{ см}^2$ ячейках (в 24-луночном планшете) в присутствии 25 мкг/мл BUdR. Иммуно-дот-анализ следует проводить следующим образом.

1. Удалите среду с клеток и лизируйте их 100 мкл раствора: $0,1\text{ М}$ трис-HCl pH 8,0; $0,1\text{ М}$ NaCl; $0,5\%$ NP-40; $0,1\%$ Argotinin.
2. По 25 мкл каждого лизата нанесите на нитроцеллюлозу, после чего фильтр высушите на воздухе.
3. Инкубируйте фильтр в течение 2 ч на качалке в 50 мл фосфатно-солевого буфера А (PBSA, Difco), содержащего 4% фосфатно-солевого буфера (BSA) и $0,02\%$ азида натрия.
4. Добавьте антисыворотку, специфичную к продукту клонированного гена (в данном случае — антигликопротеиновую VSV NJ), и инкубируйте еще в течение 2 ч на качалке.
5. Промойте фильтр 5 раз по 2 мин 50 мл PBSA.
6. Инкубируйте фильтр при мягком покачивании в течение 2 ч в PBSA, содержащем 4% BSA; $0,02\%$ азида натрия и 1 мкг меченого [^{125}I] стафилококкового белка А.
7. Промойте фильтр 5 раз по 2 мин 50 мл PBSA, высушите на воздухе и экспонируйте с рентгеновской пленкой.

Некоторые препараты моноклональных антител, которые могут использоваться в качестве первых антител при иммунодетекции, не связывают белок А. Это препятствие преодолевают следующим образом. После инкубации с первыми антителами и промывки фильтры обрабатывают поликлональными кроличьими антителами к мышиным IgG и уже затем инкубируют с меченым белком А. Альтернативным способом являются использование конъюгированных с пероксидазой антител к мышиным IgG и последующая детекция специфического связывания с помощью реакции с соответствующим хромогенным субстратом. Как видно из рис. 4, Б, те же 20 бляшек, которые дали положительный сигнал с ДНК VSV, экспрессируют продукт клонированного гена. Чувствительность ДНК-гибридизационного теста несколько выше, чем теста с применением антител, однако иммунодетекция имеет то преимущество, что, во-первых, требует меньше времени на постановку эксперимента и, во-вторых, позволяет непосредственно убедиться в том, что клонированный ген не только вошел в вирусный геном, но и экспрессируется в данной системе.

2.5.5. Выявление индивидуальных рекомбинантных бляшек в монослое

Альтернативой описанным методам, предусматривающим первоначальную селекцию рекомбинантных вирусов по их фенотипу, является прямое выявление рекомбинантных бляшек с помощью ДНК-гибридизации *in situ* или путем тестирования с помощью антител на экспрессию чужеродного гена.

Полученный после трансфекции вирусный препарат высевают на свежий клеточный монослой в таком разведении (табл. 1) (обычно с верхним агаром), чтобы на 9-см чашке получить приблизительно 100 бляшек. Если ожидаемый процент рекомбинантов мал, можно увеличить количество бляшек на монослое; если же при этом число бляшек на одной чашке будет превышать 500, следует уменьшить время инкубации инфицированного монослоя с 48 до 36 или даже до 24 ч. После того как бляшки сформировались, готовят реплику с монослоя на нитроцеллюлозный фильтр.

1. Сухой круглый нитроцеллюлозный фильтр диаметром 8 см осторожно наложите на влажный клеточный монослой с вирусными бляшками в 9 см культуральной чашке.

2. Когда фильтр полностью промокнет, наложите поверх него на несколько минут лист Whatman 3MM, пропитанный $2\times\text{SSC}$.

3. Плотнo и равномерно прижмите фильтры к чашке и затем аккуратно снимите 3MM и нитроцеллюлозу, к которой теперь прикреплен клеточный монослой. Полезно предварительно окрасить монослой $0,05\%$ -ным нейтральным красным — это позволяет легко контролировать перенос клеток на нитроцеллюлозу.

4. Поместите фильтр клеточным слоем вверх на 3 мин последовательно на листы 3ММ, пропитанные: а) 0,5 М NaOH; б) 1 М трис-HCl р 7,5; в) 2×SSC. Прогрейте фильтр при 80 °С в течение 2 ч.

Теперь фильтр можно гибридизовать с меченой ^{32}P ДНК интересующего гена по стандартной методике [22]. После отмывки и радиоавтографии фильтра бляшки, образованные рекомбинантными вирусами, отбирают из верхней агарозы, идентифицируя их по черным пятнам на радиоавтографе. Рекомбинантные бляшки можно также отобрать с заранее приготовленной вторичной нитроцеллюлозной реплики — отпечатка с первого фильтра, содержащего клеточный монослой [7]. Достоинство описанной методики состоит в том, что она пригодна для работы с любыми клеточными линиями, перmissive для вируса осповакцины.

Альтернативный метод прямого скрининга вирусных бляшек — иммунодетекция экспрессируемого продукта клонированного гена. Мы использовали этот метод преимущественно для оценки чистоты полученных вирусных препаратов, однако он в равной степени пригоден и для первичной идентификации рекомбинантов. Процедура иммуноскрининга заключается в следующем.

1. Через 36—48 ч после инфицирования клеточный монослой с примерно 200 бляшками на 9-см чашке фиксируйте 10 мл холодного метанола.

2. Промойте фиксированные клетки PBSA и инкубируйте в течение 1 ч с 5 мл 4% BSA; 0,02% азида натрия на качалке при комнатной температуре.

3. Добавьте в раствор соответствующие антитела и продолжайте инкубацию еще в течение 1 ч.

4. Промойте клетки 5 раз PBSA.

5. Добавьте 5 мл 4% BSA 0,02% азида натрия, содержащего 0,5 мкКи меченого ^{125}I стафилококкового белка А. Инкубируйте на качалке еще в течение часа.

6. Промойте клеточный монослой 10 раз PBSA, удалите ободок культуральной чашки и экспонируйте фиксированный монослой с рентгеновской пленкой. Черные пятна на радиоавтографе указывают позиции рекомбинантных бляшек, которые можно отобрать из слоя верхней агарозы.

Наряду с меченым белком А в реакции с первыми антителами можно использовать вторые антитела (к этим первым антителам), меченные ^{125}I или конъюгированные с ферментом. Конъюгаты антител с ферментами дают возможность получать окрашенные препараты так, как описано в гл. 6 данного тома. Эта методика экономит время и позволяет обойтись без радиоавтографии.

3. Характеристика рекомбинантов

3.1. Анализ вирусной ДНК

ДНК выделяют из очищенного препарата рекомбинантного вируса и используют для оценки чистоты вирусного препарата и анализа структуры вирусного генома. Рекомбинантную вирусную ДНК можно анализировать и без предварительной очистки вируса — просто выделяя суммарную ДНК из инфицированного монослоя, обрабатывая ее рестрикционными эндонуклеазами и гибридизуя «по Саузерну» с меченой ^{32}P вирусной ДНК интересующего гена. Третий подход предусматривает экстракцию суммарной ДНК из клеточного монослоя, инфицированного в присутствии $[\text{H}]$ тимидина. Рестриктазная обработка ДНК, электрофорез и последующая флюорография геля выявляют отчетливые полосы, соответствующие вирусной ДНК, на слабом фоне гетерогенных фрагментов клеточной ДНК. Процедура введения в вирусную ДНК тритиевой метки заключается в следующем.

1. Инфицируйте приблизительно 10^7 фибробластов куриного эмбриона (CEF) вирусом, выделенным из отдельной бляшки. Инфицированные клетки инкубируйте на среде, содержащей 0,5 мкКи/мл $[\text{H}]$ -тимидина (23 Ки/ммоль), пока вирусный цитопатический эффект (контролируемый с помощью микроскопа) не проявится у 80% клеток.

2. Удалите среду, клетки соскоблите в 5 мл 0,02% ЭДТА в PBS и осадите центрифугированием при 500 g в течение 5 мин.

3. Ресуспенсируйте клетки в 50 мМ трис-HCl pH; 7,8 1 мМ ЭДТА; 30% сахарозе и затем лизируйте при 4 °С, добавляя SDS до 1% и 2-меркаптоэтанол до 100 мМ.

4. После 30-минутной инкубации при 4 °С внесите протеиназу К до конечной концентрации 500 мкг/мл. Инкубируйте при 37 °С в течение 2 ч.

5. Выделите суммарную нуклеиновую кислоту, встряхивая препарат с фенолом, насыщенным 1 М трис-HCl pH 7,5. Отберите водную фазу и экстрагируйте ее смесью хлороформ:изоамиловый спирт (24:1).

6. Отберите водную фазу, добавьте к ней 1/10 объема 5М NaCl и 2,5 объема этанола и оставьте на ночь.

7. Наматывайте ДНК на стеклянную палочку, высушите ее на воздухе и растворите в 10 мМ трис-HCl pH 7,5; 1 мМ ЭДТА.

Полученную ДНК можно обрабатывать рестриктазами и фракционировать электрофоретически в 0,6%-ном агарозном геле. После 20-минутной обработки 1М салицилатом натрия гель высушивают и визуализируют меченую ^3H ДНК радиоавтографией при -70°C (на рис. 5 представлены результаты подобного экс-

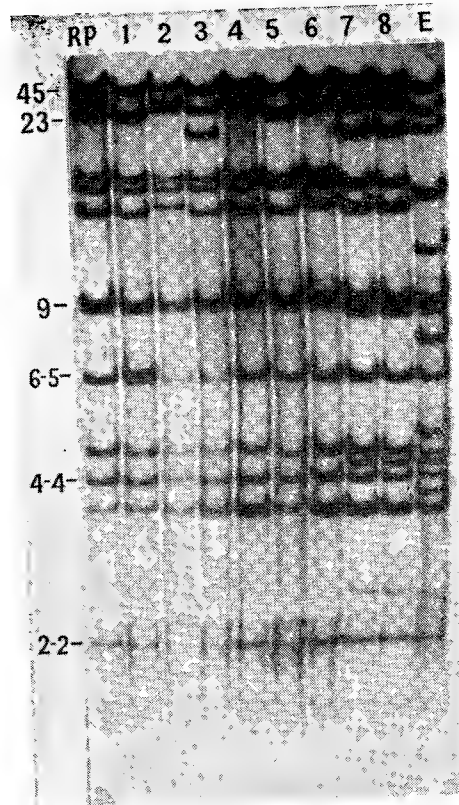


Рис. 5. Флуорограмма меченных ^3H *Hind*III-фрагментов суммарной вирусной ДНК, фракционированных в 0,6%-ном агарозном геле. RP — ДНК вируса кроличьей оспы; 1—8 — ДНК нескольких рекомбинантных форм (кроличья оспа/экстромелия); E — ДНК вируса экстромелии. Размер фрагментов указан в т.п.н.

перимента). Гидролизованые *Hind*III ^3H -ДНК были выделены из CEF (от англ. *chick embryo fibroblasts* — фибробластов куриного эмбриона), инфицированных вирусами кроличьей оспы и экстромелии, а также несколькими рекомбинантными вирусами (кроличья оспа/экстромелия). Фрагменты вирусной ДНК отчетливо выделяются на фоне слабомеченной ^3H клеточной ДНК. Последнее, вероятно, обусловлено тем, что CEF находятся в покоящемся состоянии, вследствие чего лишь небольшое количество метки включается в клеточную ДНК. При работе с другими клеточными линиями, например CV1, включение метки в собственную ДНК клеток может быть существенно выше, что в свою очередь может затруднить детектирование вирусных полос. Если рекомбинантные вирусы имеют фенотип TK^+ , применение TK^- -клеток поможет преодолеть эту трудность. Описанный метод имеет то преимущество, что не требует очистки вируса и потому позволяет легко проанализировать большое число рекомбинантов. Он особенно удобен в тех случаях, когда экспериментальная задача состоит во введении делеций в вирусный геном,

поскольку здесь нет возможности скрининга на клонированный чужеродный ген.

Чтобы более детально охарактеризовать геном рекомбинантного вируса, из очищенного вирусного препарата нужно выделить ДНК (разд. 2.3, табл. 4).

1. Внесите в очищенный препарат вируса следующие компоненты: трис-HCl pH 7,8 до 50 мМ; ЭДТА до 1 мМ; сахарозу до 27%; SDS до 1%; протеиназу К до 500 мкг/мл и инкубируйте при 37 °C в течение 2—3 ч.

2. Выделенную вирусную ДНК дважды депротеинизируйте мягкой фенольной экстракцией (фенол насыщен 10 мМ трис-HCl pH 7,5; 1 мМ ЭДТА). Следует избегать действий, способствующих фрагментированию ДНК.

3. 2 раза экстрагируйте препарат смесью хлороформ:изоамиловый спирт (24:1).

4. Отберите водную фазу, внесите в нее NaCl до 0,5 М и осадите двумя объемами этанола.

5. Аккуратно намотайте ДНК на палочку, высушите на воздухе и мягко растворите в 10 мМ трис-HCl pH 7,5; 1 мМ ЭДТА.

Достаточное количество вируса для анализа ДНК можно получить, инфицируя половинной или одной четвертой частью препарата, выделенного из отдельной вирусной бляшки, четыре 150 см² флакона с монослойной культурой BSC-1 или CV1. Можно также анализировать ДНК, выделенную из частично очищенного вируса (табл. 4, А, стадии 1—4).

3.2. Анализ продукта клонированного гена

Если при клонировании сохранены в интактном виде сигналы инициации и термации трансляции данного гена, возможна экспрессия аутентичного полипептида, который может быть охарактеризован тем или иным способом, исходя из природы клонированного гена. В том случае, когда ген кодирует фермент, определяют соответствующую энзиматическую активность в экстрактах инфицированных клеток. Этот подход был использован при клонировании гена пиримидинкиназы вируса герпеса [6, 9] и хлорамфеникол-ацетилтрансферазы [12]. Пиримидинкиназную активность определяли при помощи теста на фосфорилирование ^{125}I -дезокситидина; присутствие этого фермента в клеточном экстракте свидетельствовало о том, что клонированный ген вируса герпеса экспрессируется в рекомбинантном вирусе осповакцины. Экспрессию САТ в инфицированных рекомбинантным вирусом клетках тестировали по конверсии ^{14}C хлорамфеникола в ацетилированную форму [12]. Этот фермент довольно устойчив к однократному замораживанию — оттаиванию, поэтому клеточные экстракты для определения САТ-активности получали именно таким способом (см. также гл. 6). Другие методы

выявления экспрессируемых продуктов клонированных генов в инфицированных вирусом клетках включают радиоиммунологический анализ, «вестерн»-блот-анализ, прямой иммуоскрининг вирусных бляшек (2.5.5), иммуно-дот-анализ (2.5.4), иммунофлуоресценцию (3.2.2) и иммунопреципитацию (3.2.1).

3.2.1. Иммунопреципитация

Если имеются в распоряжении необходимые антитела, наиболее подходящим методом детекции продукта клонированного гена является пульсовое мечение инфицированных клеток с последующей иммунопреципитацией чужеродного белка и электрофорезом в полиакриламидном геле.

1. Инфицируйте вирусом (дикого типа или рекомбинантным) монослойные культуры CV1 в 25 см² флаконах при множественности 30 б.о.е. на клетку. Клетки растите в среде Игла, содержащей 0,01 мМ метионина (9 частей среды без метионина: 1 часть нормальной среды).

2. Через 2 ч добавьте 50—100 мкКи [³⁵S] метионина (100 Ки/ммоль).

3. Соберите клетки через 12 ч после инфицирования: промойте их 3 раза PBSA и соскоблите в PBS.

4. Ресуспандируйте клетки при 4°C в 0,2 мл 0,1 М NaCl; 0,1 М трис-HCl pH 8,0; 0,1% Aprotinin. Медленно добавьте 0,05 мл 2,5%-ного NP-40 и оставьте при 4°C на 10 мин.

5. Осадите ядра при 800 g в настольной центрифуге. Надосадочную жидкость инкубируйте с 25 мкл пре-иммунной кроличьей сыворотки при 4°C в течение 15 ч. Добавьте 50 мкл 20%-ного раствора стафилококкового белка А (суспензии). Инкубируйте при 4°C в течение 30 мин, периодически встряхивая пробирку.

6. Центрифугируйте 2 мин в микроцентрифуге. Соберите надосадочную жидкость и инкубируйте в течение 4 ч с 25 мкл анти-сыворотки к продукту клонированного гена (требуемое разведение определите эмпирически). Добавьте 50 мкл 20%-ного раствора белка А и инкубируйте при 4°C в течение 30 мин, периодически встряхивая пробирку. Центрифугируйте в микроцентрифуге в течение 2 мин.

7. Промойте осадок дважды раствором: 0,05 М трис-HCl pH 7,5; 0,15 М NaCl; 0,1% SDS; 1% Тритон X-100; 1% дезоксихолат натрия. Затем промойте осадок раствором: 0,4 М LiCl; 2 М мочевины; 10 мМ трис-HCl pH 8,0 (LUT). Перенесите осадок в чистую пробирку Eppendorf и еще раз промойте LUT.

8. Растворите белковый преципитат в 100 мкл раствора: 0,06 М трис-HCl pH 6,8; 3% SDS; 5% 2-меркаптоэтанол; 10% глицерин; 0,02 бромфеноловый синий. Выдержите 15 мин при 25°C и осветлите раствор коротким центрифугированием.

Прогрейте раствор при 100°C в течение 2 мин и нанесите на 10%-ный полиакриламидный гель [22].

После электрофореза полипептиды, связавшиеся в реакции иммунопреципитации, выявляются с помощью радиоавтографии.

На рис. 6 представлены результаты экспериментов, иллюстрирующие три основные методики иммунодетекции, на примере анализа экспрессии рекомбинантным вирусом осповакцины гликопротеина вируса везикулярного стоматита (штамм New Jersey). Результаты этих экспериментов демонстрируют, что все вирусы в данном препарате экспрессируют ген VSV, что продуцируемый полипептид имеет тот же размер, что и аутентичный гликопротеин, и что экспрессия гена под контролем транслоцированного промотора происходит аналогично тому, как она происходит под контролем промотора в его естественной позиции. Гликозилирование данного белка можно анализировать путем мечения инфицированных клеток [³H] глюкозамином в присутствии или в отсутствие ингибитора гликозилирования, например туникамицина [23]. Иммунопреципитация и электрофорез аутентичного белка, экспрессируемого инфицированными клетками, позволяют выявить любые нарушения в структуре продукта, кодируемого клонированным геном. Процедура мечения углеводной части белка в основном та же, что и процедура пульсового мечения белка [³⁵S] метионином, за тем исключением, что в среду с фруктозой добавляют 5—10 мкКи [³H] глюкозамина [19].

3.2.2. Иммунофлуоресценция

Во всех исследованных нами случаях в клетках, инфицированных рекомбинантным вирусом, наблюдались нормальный транспорт и субклеточная локализация чужеродного белка. Например, на рис. 7 представлена микрофотография, демонстрирующая поверхностную флуоресценцию гемагглютинирина вируса гриппа (НА) в клетках MDCK, инфицированных рекомбинантным вирусом осповакцины, экспрессирующим НА. Специфическое связывание флуоресцентно меченных антител к НА на поверхности клеток детектируется через 2 ч после инфицирования и происходит в тех же участках, что и в случае клеток, инфицированных вирусом гриппа. Эту микрофотографию и приведенную ниже методическую разработку любезно предоставил Майкл Рот из лаборатории Колд Спринг Харбор.

1. Фиксируйте клетки в свежеприготовленном 2%-ном растворе параформальдегида в PBS (для этой цели можно также использовать 10-кратное разведение 37%-ного раствора формальдегида) в течение 15—30 мин при комнатной температуре.

2. Отмойте формальдегид и остановите фиксацию, добавляя среду культивирования. Чтобы предотвратить неспецифическую

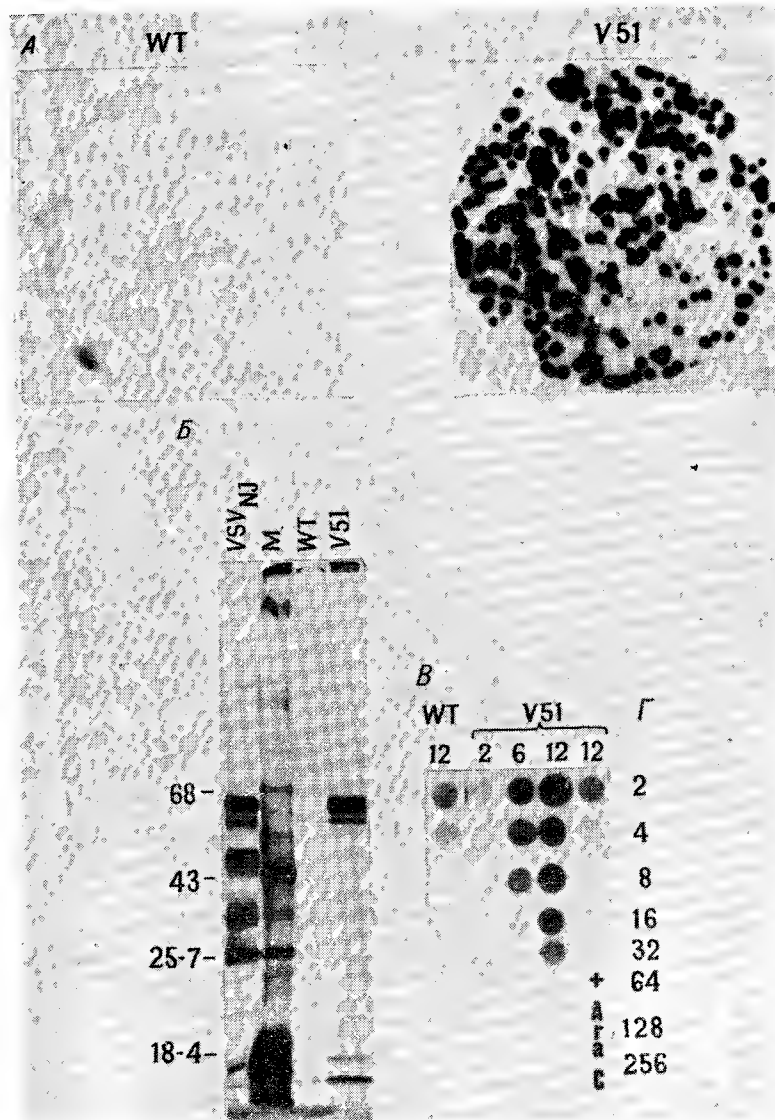


Рис. 6. А. Детекция экспрессии VSV_{NJ}G в индивидуальных вирусных бляшках. Показаны два монослоя клеток CV-1, содержащих бляшки, образованные вирусом осповакцины дикого типа (WT) и рекомбинантным вирусом (v51). Инкубация с анти-VSV_{NJ}-антителами и затем с меченым ¹²⁵I стафилококковым белком А проводилась, как описано в разделе 2.4.5. После радиоавтографии фиксированные монослои окрасили кристаллическим фиолетовым. Окрашивание выявило приблизительно одинаковое количество вирусных бляшек на клетках, инфицированных вирусом дикого типа v51. Кроме того было показано, что каждый вирус, образовавший бляшки на клеточном монослое, инфициро-

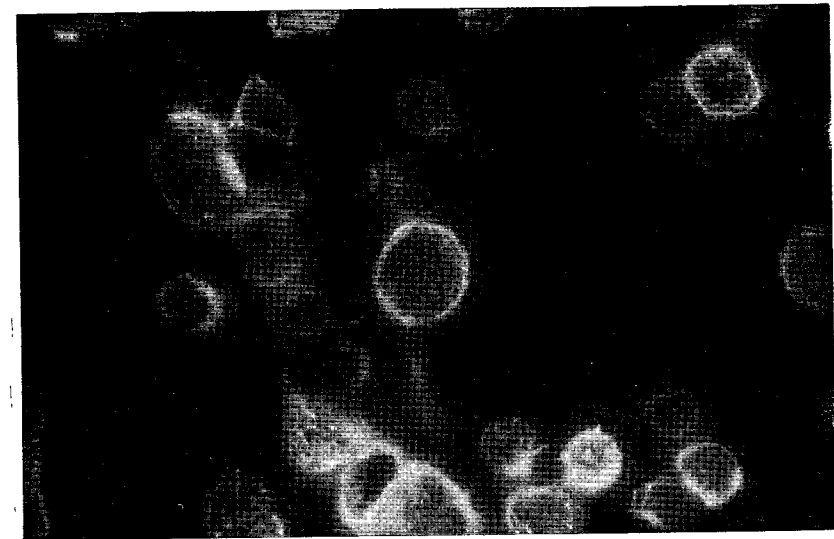


Рис. 7. Поверхностная флуоресценция клеток, инфицированных рекомбинантным вирусом осповакцины, экспрессирующим HA вируса гриппа. Клетки почки собаки инфицировали при множественности 3 б.о.е. на клетку и фиксировали через 4 ч после инфекции. Субклеточную локализацию HA определяли с помощью моноспецифической аффинно-очищенной кроличьей анти-HA-IgG-фракции и козьей антикроличьей антисыворотки, конъюгированной с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ).

сорбцию антител клеточным монослоем, клетки инкубируйте в буфере PBS, содержащем 0,5—1% BSA или желатина, в течение 30 мин.

3. Инкубируйте фиксированные клетки с таким наибольшим разведением антисыворотки, которое еще обеспечивает получение отчетливого сигнала, в течение 1 ч при комнатной температуре.

4. Отмывайте первые антитела в PBS 5 раз по 10 мин.

ванном v51, экспрессирует гликопротеин VSV. Б. Анализ полипептидов VSV, экспрессируемых рекомбинантными вирусами осповакцины. После иммунопреципитации меченные ³⁵S полипептиды из клеток, инфицированных v51, фракционировали в 10%-ном полиакриламидном геле. В качестве контроля использовали меченые белки из клеток, инфицированных VSV (VSV_{NJ}). Молекулярные массы стандартных маркеров (M) указаны в т.п.н. В. Иммуно-дот-анализ экстрактов клеток, инфицированных рекомбинантным вирусом v51 (содержащим ДНК VSV) и вирусом осповакцины дикого типа (WT) в присутствии и в отсутствие цитозин-арабинозида (Ara C). Полученные экстракты использовали для приготовления серии последовательных двукратных разведений (Г) от 1:2 до 1:256, которые затем тестировали на присутствие VSV_{NJ}G с помощью анти-VSV_{NJ}-антисыворотки и меченого ¹²⁵I белка А (разд. 2.4.4). Панели А, Б, В воспроизводят результаты радиоавтографии.

5. Перед реакцией с флуоресцентным конъюгатом вторых антител клеточный слой следует насытить буфером PBS-BSA. После реакции промывают клетки 5 раз PBS и визуализируют флуоресценцию с помощью источника света с соответствующей длиной волны.

Разведения антисыворотки для описанной процедуры подбирают эмпирически. Чтобы снизить неспецифический фон, необходимо тщательно промывать клетки, а антисыворотку перед использованием следует центрифугировать в течение 5—10 мин на микроцентрифуге. Для иммунофлуоресцентного выявления внутриклеточных продуктов клетки фиксируют в параформальдегиде и останавливают фиксацию хлоридом аммония или культуральной средой. Затем клетки делают проницаемыми, инкубируя их в течение 10—30 мин при комнатной температуре в 0,1%-ном растворе тритона X-100 в PBS, содержащем 0,25% BSA, после чего проводят иммунологические реакции, как описано выше. Для отмывки клеток рекомендуем следующий раствор: 100 мМ NaCl; 50 мМ трис-HCl pH 7,5; 0,5% NP-40, 0,25% желатин (этот раствор можно использовать в качестве буфера для иммунопреципитации). Метод с применением тритона X-100 позволяет сохранить структуру клеток неповрежденной и поэтому предпочтительнее, чем методы фиксации этанолом, метанолом или ацетоном.

Вирус осповакцины может инфицировать многие типы клеток, поэтому открывается возможность изучать транспорт специфических белков в различных дифференцированных клеточных линиях, используя рекомбинантные вирусы и иммунофлуоресцентные методы выявления экспрессируемых белковых продуктов. Одной из технических проблем здесь может быть то, что, как видно из рис. 7, уже через 4 ч после инфицирования наблюдается значительный цитопатический эффект.

4. Заключение

С помощью процедур, описанных в предыдущих разделах, можно клонировать и экспрессировать различные гетерологичные гены в вирусе осповакцины. К моменту написания этой главы таким путем была осуществлена экспрессия прокариотического гена хлорамфениколацетилтрансферазы [12], ряда генов ДНК-содержащих вирусов, гена, кодирующего поверхностный антиген вируса гепатита (HbsAg) [10], генов РНК-содержащих вирусов (клонированных в виде кДНК), например гена гликопротеина вируса везикулярного стоматита (неопубликованные данные), гена *Plasmodium knowlesi*, кодирующего поверхностный антиген [20]. В модельных экспериментах на животных было продемонстрировано, что рекомбинантные вирусы, экспрессирующие гены ряда патогенных агентов, способны защитить животное от заболеваний, вызываемых этими агентами. Так, на-

пример, обезьяны, вакцинированные рекомбинантным вирусом осповакцины, экспрессирующим HbsAg, не заболевали при заражении вирусом гепатита [21]. Примечательно, что животные, вакцинированные рекомбинантным вирусом, экспрессирующим НА вируса гриппа, продуцируют не только циркулирующие антитела, специфичные к НА, но также и цитотоксические лимфоциты, узнающие молекулы НА (Bennink, неопубликованные данные). Это свидетельствует о том, что экспрессируемый рекомбинантным вирусом в организме животного гетерологичный белок обеспечивает иммунный ответ как гуморального, так и клеточного типа.

В вирусе осповакцины можно клонировать фрагменты экзогенной ДНК размером до 25 т. п. н. [11]. Поэтому вполне естественно ожидать, что будут сконструированы вирусы, экспрессирующие сразу несколько гетерологичных белков. Такие вирусы могут послужить основой для получения поливалентных вакцин, эффективных против различных комбинаций патогенов, встречающихся в разных географических областях. Можно предполагать, что подобные вакцины найдут широкое применение в медицине и ветеринарии.

Литература

1. Subramani S., Southern P. L. *Analyt. Biochem.*, 135, 1 (1983).
2. Rigby P. W. J. *J. Gen. Virol.*, 64, 255 (1983).
3. Dales S., Pogo B. G. T. *Virol. Monogr.*, 18, 1 (1981).
4. Moss B. *Poxviruses*. In: *Molecular Biology of Animal Viruses*, Nayak D. P. (ed.), Vol. 2, pp. 849 (1978).
5. Weir J. P., Moss B. *J. Virol.*, 46, 530 (1983).
6. Panicali D., Paoletti E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 4927 (1982).
7. Panicali D., Davis S. W., Weinberg R. L., Paoletti E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 5364 (1983).
8. Paoletti E., Lipinkas B. R., Samsonoff C., Mercer S., Panicali D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 193 (1984).
9. Mackett M., Smith G. L., Moss B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 7415 (1982).
10. Smith G. L., Mackett M., Moss B. *Nature*, 302, 490 (1983).
11. Smith G. L., Moss B. *Gene*, 25, 21 (1983).
12. Mackett M., Smith G. L., Moss B. *J. Virol.*, 49, 857 (1984).
13. Weir J. P., Bajszar G., Moss B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1210 (1982).
14. Sam C. K., Dumbell K. R. *Ann. Virol. (Inst. Pasteur)*, 132E, 135.
15. Nakano E., Panicali D., Paoletti E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 1593 (1982).
16. Ensinger M. J. *J. Virol.*, 43, 778 (1982).
17. Villareal L. P., Berg P. *Science*, 196, 183 (1977).
18. Joklik W. K. *Virology*, 18, 9 (1962).
19. Payne L. G., Kristensson K. J. *Virol.*, 41, 367 (1982).
20. Smith G. K., Godson G. N., Nussenzweig V., Nussenzweig R., Barnwell J., Moss B. *Science*, (1984), in press.
21. Moss B., Smith G. L., Gerin J. L., Purcell R. H. *Nature*, 311, 67 (1984).
22. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982.

ВИРУС БЫЧЬЕЙ ПАПИЛЛОМЫ: ЭУКАРИОТИЧЕСКИЙ ВЕКТОР ДЛЯ МОЛЕКУЛЯРНОГО КЛОНИРОВАНИЯ

М. Саверия Кампо

1. Введение

За последние годы достигнуты большие успехи в создании векторов для молекулярного клонирования, которые позволяют экспрессировать клонированные гены в бактериальных клетках и получать целый ряд эукариотических белков в прокариотических системах.

Тем не менее особенности белок-синтезирующего аппарата бактерий накладывают определенные ограничения на возможность экспрессии в них многих эукариотических белков. Бактериальные клетки неспособны обеспечить необходимые посттрансляционные модификации синтезируемых белков — гликозилирование, процессинг и сборку олигомерных белков. Кроме того, клетки *E. coli*, — наиболее широко распространенного бактериального хозяина, — не секретируют белки в среду культивирования. Вдобавок отметим, что изучение некоторых аспектов функционирования эукариотических генов, таких как реакция на индукторы гормональной или вирусной природы, влияние метилирования, взаимодействие со специфическими клеточными белками, просто невозможно при использовании бактериальных систем.

Следовательно, необходимы такие векторные системы, которые позволяли бы вводить клонированные эукариотические гены в эукариотические клетки и обеспечивали бы их экспрессию в контролируемом генетическом окружении. Большинство известных в настоящее время эукариотических экспрессирующих векторов являются производными вирусных репликонов. Так, для клонирования и экспрессии чужеродных генов в культивируемых клетках широко используются векторы на базе SV40 и аденовирусов (см. например, обзор [1]). Однако эти системы имеют ряд недостатков. В частности, завершение репродуктивного цикла данных вирусов сопровождается гибелью клеток-хозяев, что препятствует получению клеточных линий, в которых клонированные гены могли бы реплицироваться и экспрессироваться достаточно долго. С другой стороны, непермиссивные трансформированные клетки содержат лишь несколько копий вирусной ДНК, которые стабильно интегрированы в хозяйский геном. Вот почему в данном случае, в противоположность литическому циклу, в трансформированных клетках не происходит

амплификация и экспрессия клонированных генов. Следует учитывать и то, что интеграция представляет собой случайное событие и, следовательно, нельзя контролировать, в какое генетическое окружение попадет приобретенная последовательность ДНК. Исключительная сложность эукариотического генома, влияние оказавшихся по-соседству генетических элементов, эффекты вторичных модификаций (такие, например, как структурирование хроматина и метилирование) делают невозможной адекватную оценку экспрессии чужеродных генов и анализ их функций.

Из всего сказанного ясно, что для преодоления трудностей необходим вектор, способный стабильно реплицироваться, обеспечивая независимую от хромосомного контроля репликацию и экспрессию клонированного гена, и не вызывающий лизиса клеток. Таким требованиям удовлетворяет ДНК вируса бычьей папилломы. Этот вирус (BPV-1) *in vivo* вызывает опухоли эпителиального и мезенхимного происхождения, а *in vitro* способен трансформировать клетки быка и грызунов. В инфицированных или трансформированных клетках вирус персистирует исключительно в виде множества копий свободной кольцевой ДНК. Эта особенность его биологии обусловила повышенный интерес к нему, как к потенциальному вектору для молекулярного клонирования в эукариотических клетках (см. обзоры 2 и 3).

В данной главе мы кратко остановимся на наиболее примечательных особенностях строения и функционирования генома BPV-1, рассмотрим полученные в разных лабораториях рекомбинантные плазмиды на основе BPV-1 и их трансформирующие свойства, и кроме того коснемся целого ряда эукариотических генов, которые к настоящему времени клонированы в составе векторов на базе BPV-1.

2. Вирус BPV-1

Подробный анализ некоторых сторон жизненного цикла этого вируса несколько затруднен ввиду отсутствия подходящей системы *in vitro*. Вот почему наши представления о структурной и функциональной организации вирусного генома, о механизмах, регулирующих во времени его репликацию и транскрипцию, а также вопросы, касающиеся идентификации и функционирования продуктов вирусных генов, разработаны не так глубоко, как в случае других мелких ДНК-содержащих опухолевых вирусов. В то же время, клонирование вирусного генома в составе бактериальных плазмид позволило сильно продвинуться в плане изучения его молекулярно-биологических характеристик. Ниже мы кратко коснемся тех аспектов биологии вируса BPV-1, которые имеют отношение к вопросу использования его ДНК в качестве эукариотического вектора.

2.1. Структурная и функциональная организация генома BPV-1

Геном BPV-1 представлен кольцевой двухцепочечной ДНК и насчитывает 7954 п. н. [4]. Физическая карта этого вируса была составлена в нескольких лабораториях [5—7]; не так давно определена его полная нуклеотидная последовательность [4].

В отличие от SV40 или вируса полиомы в геноме BPV-1 открытые рамки считывания расположены только на одной цепи ДНК [4], т. е. транскрипция во всех случаях происходит только в одном направлении [8—10]. Две из четырех важнейших открытых рамок локализованы в области, ответственной за трансформацию (см. ниже); они обозначены как E1 и E2 (от англ. *early* — ранние) и включают соответственно 1814 и 1229 п. н. (рис. 1А). Две другие открытые рамки L1 и L2 (от англ. *late* — поздние), расположены в структурной области генома (см. ниже) и насчитывают соответственно 1484 и 1406 п. н. (рис. 1А). В области, определяющей трансформирующую активность вируса, локализуется еще несколько небольших открытых рамок считывания, обозначенных E4—E8. Последовательности L1 и L2 считываются в одной и той же фазе и разделены в геноме единственным стоп-кодоном. В то же время E-последовательности считываются в трех рамках; некоторые из этих последовательностей частично или полностью перекрываются (рис. 1А). Участок вирусного генома, расположенный между 3'-концом L1 и 5'-концом E6 (длиной 1000 п. н.) не содержит открытых рамок считывания. Этот чувствительный к ДНКазе I участок [11] содержит транскрипционные регуляторные элементы, вероятно выполняющие функции промоторов [4, 12, 13] (рис. 1Б) и потому играет определяющую роль в жизненном цикле вируса. У дистального конца ранней области, необходимой для реализации трансформирующей способности BPV-1, локализуется усилитель транскрипции (энхансер) [12] (рис. 1Б), который может быть заменен энхансером SV40 или вируса полиомы [14]. Сигналы полиаденилирования обнаружены на 3'-конце ранней области (позиция 4179) и на 3'-конце поздней области (позиция 7091 и 7155) [4].

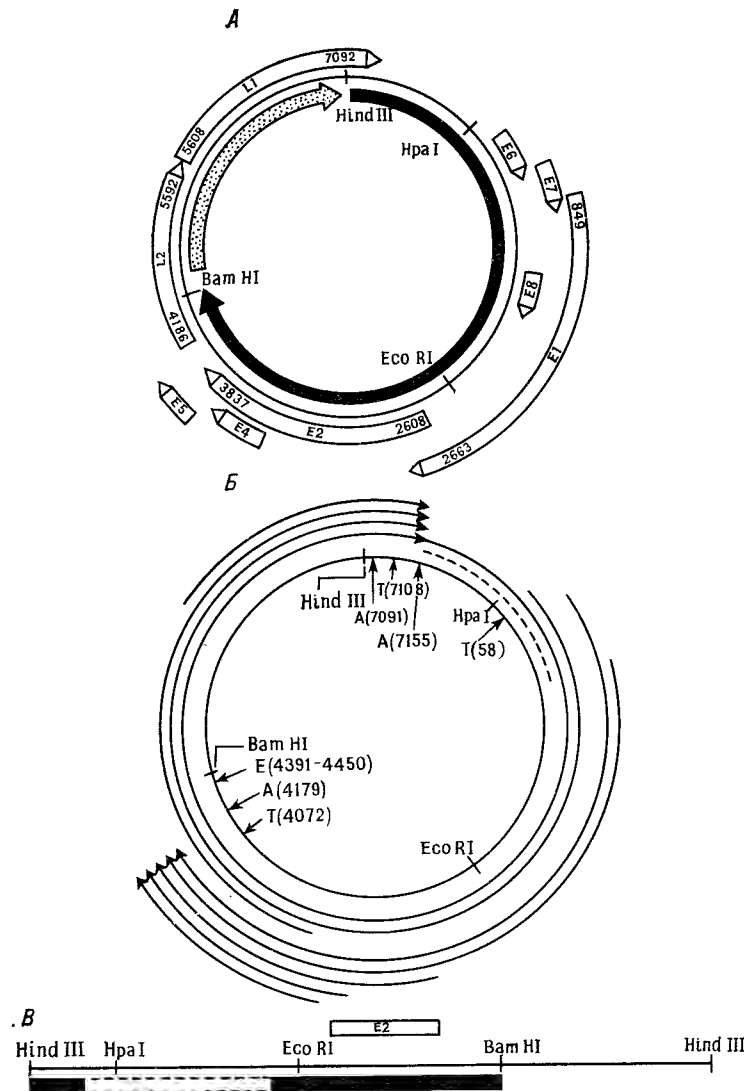


Рис. 1. Структурная организация генома вируса бычьей папилломы (BPV-1). А. Зачерненный участок — трансформирующий *Hind*III-*Bam*HI-фрагмент (69% генома). Заштрихованный участок — структурный *Bam*HI-*Hind*III-фрагмент (31% генома). Контурные стрелки — ранние (E1—E8) и поздние (L1—L2) открытые рамки считывания. Описанные ранее открытые рамки E2 и E3 оказались одной непрерывной рамкой считывания E2: в позиции 3444 был обнаружен добавочный G (А. Stenlund, личное сообщение). Стрелками показано направление транскрипции; цифрами обозначены позиции старт- и стоп-кодонов. Первый нуклеотид уникального *Hpa*I-сайта соответствует позиции 1;

*Hpa*I-сайт соответствует 0/1,0 ед. карты. Б. Вирусные транскрипты, обнаруживаемые в трансформированных клетках, показаны открытыми стрелками. Закрытыми стрелками показаны вирусные РНК, появляющиеся в продуктивных папилломах. Пунктиром обозначены предполагаемые 5'-концевые лидерные последовательности. Т—ТАТА-бокс; Е — энхансер; А — сайт полиаденилирования. В. Прямой линией представлен линейризованный геном BPV-1. Зачерненные участки — *цис*-действующие элементы, необходимые для трансформации клеток *in vitro*. Пунктиром обозначена область делеции. Вверху показана открытая рамка считывания E2. (Использованы данные, опубликованные в работах [4, 8, 9, 10, 12, 13, 14 и 15].)

2.2. Трансформирующие свойства BPV-1

Область вирусного генома, определяющая его способность трансформировать клетки и существовать в них в форме свободных эписом, локализуется в *HindIII-BamHI*-фрагменте (5,4 т. п. н.), представляющем 69% всей вирусной ДНК [15] (рис. 1А и 1В). Этот фрагмент получил название 69Т. Используя делеционные мутанты, Накабаяши с сотр. [13] показали, что для реализации функции трансформации необходимы два интактных сегмента 69Т-фрагмента (в *цис*-положении): один из них находится у 5'-конца 69Т-фрагмента и соответствует той области, где локализуются транскрипционные контролирующие элементы [12]; другой представляет собой участок длиной 2,3 т. п. н. у 3'-конца 69Т-фрагмента и включает открытую рамку Е2 (рис. 1В). В клетках, трансформированных делеционными мутантами, содержащими описанные сегменты, обнаруживается лишь по несколько интегрированных в геном копий вирусной ДНК; следовательно, трансформирующая способность и способность существовать в форме эписомы определяются разными областями вирусного генома. По всей вероятности, ответственной за эписомное состояние является открытая рамка считывания Е1.

2.3. Транскрипция вирусных генов

Специфические вирусные транскрипты были идентифицированы как в продуктивных клетках папилломы, так и в непродуктивных трансформированных клетках [8—10]. В трансформированных клетках присутствуют пять видов мРНК, которые, очевидно, все синтезируются на ДНК-матрицах, входящих в состав 69Т-фрагмента. Эти транскрипты имеют длину 4050, 3800, 1700, 1150 и 1050 нуклеотидов; 3'-концы у них совпадают и определяются сигналом полиаденилирования в позиции 4179 [8, 9]. 5'-концы транскриптов картируются соответственно в точках 0,03, 0,34, 0,39 и 0,41 [9]. 5'-лидерные последовательности картируются отдельно в районе 0,9—0,1. Это указывает на то, что ранние транскрипты формируются путем дифференциального сплайсинга общего лидера с несколькими основными РНК.

Помимо транскриптов, свойственных трансформированным клеткам, в опухолях обнаруживаются еще пять вирусных транскриптов. Их длина составляет 8000, 6700, 3800, 3700 и 1700 нуклеотидов. 3700-нуклеотидная РНК охарактеризована недостаточно полно, и в дальнейшем мы ее обсуждать не будем. Четыре других, специфичных для опухолей транскрипта имеют совпадающие 3'-концы, картирующиеся в точке 0,9, что соответствует сигналам полиаденилирования в позиции 7091 и 7155; 5'-концы этих РНК картируются соответственно в точках 0,9, 0,01, 0,42 и

0,71 [10]. Не исключено, что два самых крупных транскрипта представляют собой не прошедшие сплайсинг предшественники как ранних, так и поздних транскриптов. Это предположение постулирует существование регуляторных механизмов, определяющих выбор сигналов сплайсинга и терминирования транскрипции на различных стадиях жизненного цикла вируса. Остается неясным, находятся ли эти механизмы под контролем вирусного генома или же они свойственны дифференцирующимся кератиноцитам.

3. BPV-1 в качестве вектора

Методы, используемые для создания рекомбинантных плазмид на основе BPV-1 включают стандартные генно-инженерные манипуляции, описанные во многих руководствах по молекулярному клонированию [16]. В данной главе мы подробно рассмотрим свойства этих векторов и их трансформирующую способность. Затем мы остановимся на BPV-1-плаزمиде, несущих дополнительно доминантные селективные маркеры. Эти конструкции успешно использовались для клонирования эукариотических генов и их последующей характеристики. Конкретные приемы клонирования и экспрессии чужеродных генов в BPV-векторах проиллюстрированы на рис. 6—12.

3.1. Рекомбинантные плазмиды на основе BPV-1

Для клонирования полноразмерной ДНК BPV-1 или 69Т-фрагмента использовали бактериальную плазмиду pBR322 [17] и ее делеционные мутанты pAT152 [18], pBR327 [19] и pML2 [20]. Все эти плазмиды, за исключением pBR322, не содержат «токсичную» последовательность, соответствующую области 2067—2533 рестрикционной карты, которая, по имеющимся данным, ингибирует репликацию ДНК SV40 в клетках мартышки [20] (табл. 1).

Таблица 1. Делеционные мутанты pBR322, используемые для клонирования ДНК BPV-1

Плаزمида	Делеция ¹⁾	Длина ²⁾	Источник данных
pBR322	—	4,4	[17]
pAT153	1646—2451	3,7	[18]
pBR327	1440—2500	3,3	[19]
pML2	1095—2485	3,0	[20]

¹⁾ Нуклеотиды, ограничивающие область делеции [29].

²⁾ Длина в т. п. н., округленная до первого десятичного знака.

Таблица 2. Рекомбинантные плазмиды BPV-1

Рекомбинантная плазмида	Вектор	Клонированная область генома BPV-1	Сайт	Источник данных
pBPV-1 8-2	pBR322	Полный геном	<i>Bam</i> HI	[25]
pBPV-1 9-1	pBR322	»	<i>Hind</i> III	[25]
pBPV69T	pBR322	69T-фрагмент	<i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI	[15]
pBV1	pAT153	Полный геном	<i>Hind</i> III	[26]
pBV1-D1	pAT153	69T-фрагмент	<i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI	[22]
pd1BPV69T	pML2	»	<i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI	[25]
pdBPV69T	pML2	»	<i>Bam</i> HI ¹⁾	[25]
pdBPV-1	pML2d ²⁾	Полный геном	<i>Bam</i> HI ³⁾	[25]
pB2	pBR322	»	<i>Bam</i> HI	[24]
pMB2	pML2	»	<i>Bam</i> HI	[24]
pMH4	pML2	»	<i>Hind</i> III	[24]
pM69	pML2	69T-фрагмент	<i>Hind</i> III- <i>Bam</i> HI	[24]

¹⁾ Плазмида pdBPV69T получена из pd1BPV69T в результате конверсии уникального *Hind*III — сайта в сайт *Bam*HI.

²⁾ Плазмида pML2d получена путем расщепления pdBPV69T *Bam*HI с последующей ресциклизацией.

³⁾ Плазмида pdBPV-1 получена путем введения линейаризованной *Bam*HI ДНК BPV-1 в уникальный *Bam*HI-сайт pML2d.

Следовательно, эти плазмиды можно использовать для осуществления BPV-1-зависимой трансформации клеток, не прибегая к предварительному разделению вирусной и плазмидной ДНК (см. ниже).

В табл. 2 приведены известные в настоящее время BPV-1 — плазмиды; их структура схематически изображена на рис. 2. Эти плазмиды были использованы для трансформации клеток линий C127 и NIH3T3 (мышинные фибробласты) [15, 21, 22, 23] и крысиных фибробластов FR3T3 [24] путем трансфекции.

Эффективность трансформации, достигнутая в типичных экспериментах, указана в табл. 3. Методика трансфекции с последующей селекцией трансформантов на основе морфологических изменений описана в табл. 4. В случае рекомбинантной конструкции на основе pBR322 как полноразмерная ДНК BPV-1, так и 69T-фрагмент утрачивали трансформирующую способность, однако восстанавливали ее после выщепления из состава рекомбинантной плазмиды. Такое *цис*-ингибирование обусловлено, по всей видимости, присутствием в pBR322 «токсичной» последовательности, которая подавляет репликацию ДНК SV40 в обезьяньих клетках [20]. В противоположность этому плазмиды pAT153 и pML2, которые утратили «токсичную» последовательность в результате делеции (табл. 1), не подавляют трансформирующую активность полноразмер-

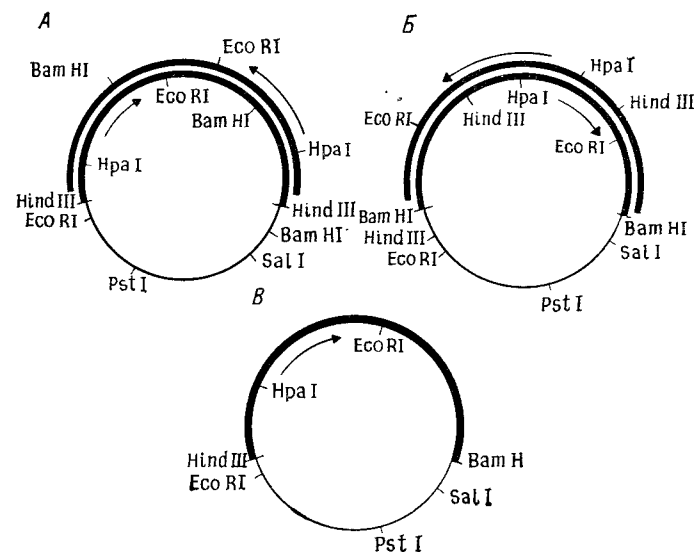


Рис. 2. Схематическое изображение «родительских» плазмид на базе BPV-1. Во всех случаях тонкой линией изображена ДНК прокаротического вектора, а жирной линией — вирусная ДНК. В качестве вектора могут выступать pBR322, pAT153 или pML2. А. Полноразмерная ДНК BPV-1 введена в *Hind*III-сайт. Показаны обе возможные ее ориентации относительно векторной ДНК. Б. Полноразмерная ДНК BPV-1 введена в *Bam*HI-сайт. Вирусная ДНК представлена в обеих ориентациях. В. *Hind*III-*Bam*HI-69T фрагмент состыкован с большим *Hind*III-*Bam*HI-фрагментом вектора. Поскольку для клонирования использованы разноименные рестрикционные сайты, возможна только одна ориентация вирусной ДНК в составе рекомбинантной конструкции. На этом, а также на всех последующих рисунках, масштаб генетической карты не соблюден; показаны только некоторые рестрикционные сайты. Стрелки указывают направление транскрипции.

ной ДНК BPV-1 в отношении мышинных фибробластов NIH3T3 и C127. Вызывает, однако, удивление, что нерасщепленная плазмида pMB2 (ДНК BPV-1 в составе pML2) не трансформирует крысиные фибробласты FR3T3 [24] (табл. 3). Возможно, эти различия обусловлены разницей в генетической конституции хозяйских клеток. Эксперименты по трансформации клеток плазмидами pBV1-D1 и pdBPV69T (69T-фрагмент в составе pAT153 и pML2, соответственно) (табл. 2) тоже продемонстрировали различия. В то время как pBV1-D1 трансформирует клетки NIH3T3 с равной эффективностью до и после расщепления [22], pdBPV69T способна к трансформации C127 только будучи расщепленной [25] (табл. 3). Причины этого неясны; возможно, данное явление связано с различным происхождением NIH3T3 и C127 клеток. Впрочем, такое предположение маловероятно, поскольку нерасщепленная плазмида pBV1-D1 способна

Таблица 3. Эффективность трансформации клеток рекомбинантными плазмидами BPV-1

Плазмида	Фермент	Клетки	Количество фокусов ¹⁾	Источник данных
pBPV-1 8-2	—	C127	2	[25]
	BamHI	C127	246	
pBPV-1 9-1	—	C127	1	[25]
	HindIII	C127	197	
pBPV69T	—	C127	1	[25]
	HindIII-BamHI	C127	107	
pBV2 ²⁾	—	NIH3T3	384	[22]
	HindIII	NIH3T3	667	
pBPV-1-DI	—	NIH3T3	300	[22]
	HindIII-BamHI	NIH3T3	280	
pdBPV-1	—	C127	198	[25]
	BamHI	C127	200	
pdBPV69T	—	C127	0	[25]
	BamHI	C127	126	
pB2	—	FR3T3	1	[24]
	BamHI	FR3T3	250	
pMB2	—	FR3T3	1	[24]

¹⁾ Клетки трансформировали указанными ДНК с помощью кальций-фосфатного метода [27], а в работе [25] — с последующим глицериновым шоком [28]. Эффективность трансформации оценивали по числу фокусов на 10^6 клеток на 1 мкг рекомбинантной ДНК [22, 24] или на 1 мкг вирусной ДНК [25].

²⁾ pBV1 и pBV2 демонстрировали одинаковую эффективность трансформации до и после расщепления *HindIII* (Campro, Spandidos, неопубликованные данные). В таблице приведены результаты для pBV2.

Таблица 4. Трансфекция рекомбинантной ДНК и селекция морфологических трансформантов

А. Трансфекция рекомбинантной ДНК BPV (см. гл. 6 разд. 5)

1. Отщепите от рекомбинантной конструкции pBR322-BPV плазмидную часть с помощью подходящей рестриктазы, чтобы удалить «токсичную» последовательность. При работе с векторами pAT153, pBR327, pML2 используйте интактные сверхспирализованные плазмиды.

2. За день до планируемого опыта по трансфекции высейте клетки, с которыми будет проводиться эксперимент, (10^4 клеток/см²) на среду, содержащую 15% FCS.

3. Растворите донорную ДНК в 0,1 мМ ЭДТА; 1 мМ трис-HCl pH 8,0 и добавьте 2,5 М CaCl₂ до концентрации 125 мМ. Концентрация ДНК должна составлять 20 мкг/мл. Если в эксперименте используется менее 1 мкг ДНК, добавьте ДНК-носитель.

4. Смешайте раствор ДНК с равным объемом буфера 2×HBS¹⁾ и пипеткой нанесите преципитат на клетки.

5. Инкубируйте клетки при 37°C в течение 3–4 ч и затем проведите глицериновый шок (см. гл. 15, разд. 3.2) — в ряде случаев эта процедура повышает эффективность трансфекции. Можно опустить глицериновый шок — в этом случае клетки следует выдержать с преципитатом в течение 18 ч.

6. Удалите среду, промойте клетки средой без сыворотки и залейте свежей средой, содержащей 15% FCS. Инкубируйте при 37°C в течение 24 ч.

Продолжение

Б. Селекция морфологических трансформантов

1. Удалите среду культивирования и замените ее средой, содержащей только 5% FCS. Меняйте среду каждые 3 дня на протяжении приблизительно трех недель. Концентрацию сыворотки в среде поддерживайте на уровне 5%. По прошествии указанного времени становятся различимы фокусы трансформации. Если потребуется, их можно сосчитать.

2. Ограничьте каждый индивидуальный фокус небольшим кольцом из нержавеющей стали; клетки внутри кольца трипсинизируйте, инкубируя их в течение 2–3 минут при комнатной температуре в 0,1 мл стерильного буфера PBS²⁾, содержащего 0,25% трипсина и 1 мМ ЭДТА. На нижнюю кромку кольца следует нанести слой силиконовой смазки, чтобы обеспечить герметичность их контакта с дном культуральной чашки. С помощью пипетки отберите трипсинизированные клетки, осадите их центрифугированием и ресуспендируйте в 0,2 мл среды.

3. Смешайте суспензию клеток с 20 мл среды, содержащей 0,9% метоцелла MC 4000 CP (Fluka) и 20–30% FCS и высейте на чашки. Повышенное содержание сыворотки увеличивает эффективность посева.

4. Инкубируйте чашки при 37°C в течение 10 дней. К этому времени на поверхности среды становятся видны колонии.

5. С помощью пастеровской пипетки отберите индивидуальные колонии и нарастите их в свежей среде. Описанная селекционная процедура позволяет получать линии клеток, утративших реакцию контактного ингибирования и не нуждающихся в закреплении на субстрате. Опухолеродность этих клеточных линий тестируют путем подкожного введения $3\text{--}5 \cdot 10^6$ клеток бестимусным мышам.

¹⁾ Состав HBS описан в гл. 6 (разд. 5.1).

²⁾ PBS: 8,0 г/л NaCl; 0,2 г/л KCl; 1,15 г/л Na₂HPO₄; 0,2 г/л KH₂PO₄.

также индуцировать трансформацию клеток C127 с эффективностью около 100 фокусов/мкг ДНК (ДиМайо, личное сообщение). Таким образом, несмотря на то, что оба вектора имеют сходные делеции (табл. 1), плазмида pAT153 оказывается более эффективной для клонирования 69T-фрагмента.

Эффективность трансформации в случае использования 69T-фрагмента составляет приблизительно 30% от таковой при использовании полноразмерного генома [15, 13]. Вероятно, оставшая часть генома, непосредственно не участвующая в трансформационном процессе, оказывает на него стимулирующее влияние, благодаря присутствию дополнительных транс-крипционных контролирующих элементов.

Клетки, трансформированные рекомбинантными ДНК BPV-1, обнаруживают такую же морфологию и такие же свойства (рост в агаре, способность вызывать опухоли) как и те клетки, которые были трансформированы интактным вирусом [15, 21, 22]; вирусная ДНК здесь также обнаруживается в неинтегрированной форме. В клетках, трансформированных линейаризованной ДНК BPV-1, происходит ее рециклизация, так что вирусный геном присутствует в форме мономерных эписом [23]. В клетках, трансформированных 69T-фрагментом, циклизация вирусной ДНК сопровождается приобретением новых (клеточных?)

Таблица 5. Выделение низкомолекулярной ДНК из трансформированных клеток (по методике [30])

1. Удалите среду культивирования и промойте клетки 0,15 М NaCl; 10 мМ трис-HCl pH 7,5; стараясь не повредить монослой.
2. Добавьте 0,6% SDS; 10 мМ ЭДТА; 10 мМ трис-HCl pH 7,5 (20 мл на 75 см² флакон). Распределите раствор равномерно и инкубируйте при комнатной температуре в течение 10–20 мин.
3. Пересейте клеточный лизат во флакон и внесите 5 мл NaCl (конечная концентрация соли 1 М); осадок сформируется немедленно. Оставьте на ночь или на более длительное время при 4°C. В этих условиях высокомолекулярная ДНК преципитирует, а низкомолекулярная остается в растворе.
4. Центрифугируйте при 25 000 об/мин в течение 1 ч при 4°C. Надосадочную жидкость сохраните.
5. Экстрагируйте надосадок равным объемом фенола, насыщенного 10 мМ NaCl; 10 мМ ЭДТА; 50 мМ трис-HCl pH 8,0.
6. Центрифугируйте при 10 000 об/мин в течение 10 мин, отберите водную фазу и экстрагируйте ее равным объемом смеси фенол/хлороформ (1:1).
7. Центрифугируйте в тех же условиях еще раз, отберите водную фазу и осадите ДНК тремя объемами охлажденного этанола, выдержав препарат ночь или более длительное время при –20°C.
8. Соберите осадок ДНК центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 20 мин.
9. Промойте осадок дважды 70%-ным этанолом, содержащим 0,2 М NaCl, и один раз просто 70%-ным этанолом.
10. Подсушите осадок и ресуспендируйте ДНК в 0,2 М NaCl; 1 мМ ЭДТА; 10 мМ трис-HCl pH 7,5.
11. Внесите РНКазу до концентрации 20 мкг/мл и инкубируйте при 37°C в течение 1 ч.
12. Экстрагируйте равным объемом смеси фенол-хлороформ.
13. Повторите этапы 7–9.
14. Подсушите осадок и ресуспендируйте ДНК в 1 мМ ЭДТА; трис-HCl pH 7,5. Препарат ДНК готов для трансфекции.

последовательностей или же дубликацией вирусных последовательностей [23]. Последнее наблюдение заставляет предположить, что для репликации ДНК необходимо, чтобы ее длина находилась в определенных пределах, независимо от источника и природы приобретенных последовательностей. Этот вывод, в свою очередь, может указывать на вероятную причину более высокой трансформационной активности полноразмерной ДНК BPV-1 по сравнению с 69Т-фрагментом.

В мышинных клетках, трансформированных интактными BPV-1-плазмидами, гибридные молекулы присутствуют в виде множественных копий интактных неинтегрированных мономеров [22, 25]. Реорганизация интактных плазмид более свойственна крысиным фибробластам; по большей части — это делеции [24].

Интактные BPV-1-плазмиды можно «спасти» (наработать и выделить) в *E. coli* путем трансфекции бактериальных клеток низкомолекулярной ДНК, выделенной из трансформированных клеток. Соответствующая методика приведена в табл. 5. Выделенные из *E. coli* плазмиды имеют ту же структуру и такие же

трансформирующие свойства, что и оригинальные ДНК [24, 25]. Это наблюдение послужило отправной точкой в разработке векторов на базе BPV-1. Способность BPV-1-плазмид существовать в форме автономных репликонов как в прокариотических, так и в эукариотических клетках, обуславливает возможность их применения в качестве челночных векторов для генетического переноса между клетками млекопитающих и бактериальными клетками. Такие векторы уже применялись при исследовании особенностей регуляции функционирования генов (см. ниже) и без сомнения окажутся весьма полезными для выделения специфических генов. Интересующие гены можно отбирать, руководствуясь фенотипическими изменениями, наблюдаемыми в клетках млекопитающих, и затем нарабатывать в препаративных количествах в *E. coli*, что обеспечит возможность их детального изучения.

3.2. Гибридные плазмиды, экспрессирующие селективные маркеры

Один из главных недостатков векторных систем на основе BPV-1 заключается в том, что идентификацию трансформантов проводят на основе морфологии контактно ингибированных клеток. Это ограничивает круг возможных хозяев для BPV-1 только теми клетками, которые способны формировать фокусы. Введение в плазмиды на основе BPV-1 доминантных селективных маркеров позволило расширить выбор хозяев для этих векторов за счет клеток, которые не экспрессируют трансформированный фенотип, однако способны поддерживать репликацию BPV-1-эписом.

Биохимические маркеры, используемые в настоящее время в векторах на базе BPV-1, включают продукты генов тимидинкиназы (*tk*) вируса простого герпеса типа 1 (HSV-1), ксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (*gpt*) *E. coli* и аминокликозид-3'-фосфотрансферазы (*aph*, ген устойчивости к неомицину) из транспозона Tn 5.

3.2.1. Гибридные плазмиды BPV-*tk*

К ним относятся плазмиды, содержащие ген *tk* вируса герпеса, состыкованный с 69Т-фрагментом BPV-1 (рис. 3). Они способны трансформировать ряд клеточных линий TK^- , сообщая им фенотип TK^+ : мышинные L-клетки, ВНК21, крысиные клетки Rat2 и человеческие клетки 143 [14, 33]. Плазмиды pMLBPVTK2 и pMLBPVTK4 трансформируют крысиные клетки Rat2 и человеческие 143 эффективнее, чем родительская плазида pMLTK (табл. 6), причем это более заметно на крысиных клетках. По-

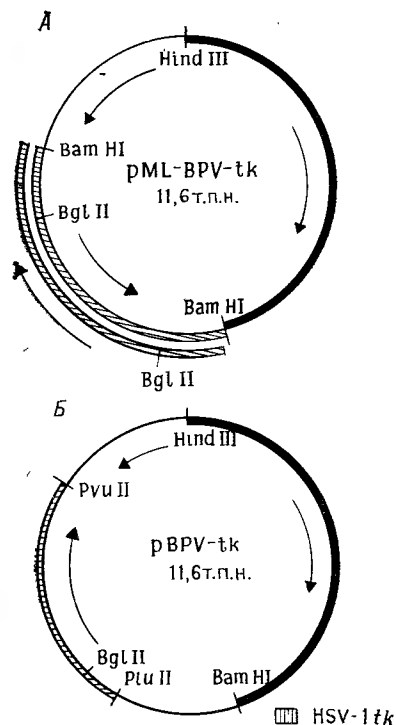


Рис. 3. Рекombинантные плазмиды BPV-1-tk. А. pML-BPV-tk получена путем введения *Bam*HI-фрагмента (3,4 т.п.н.), содержащего ген *tk* HSV-1 [28] в *Bam*HI-сайт pML-BPV 69T. Показаны две возможные ориентации гена *tk*. В pML-BPV-tk4 направление транскрипции гена *tk* совпадает с направлением транскрипции 69T-фрагмента, а в pML-BPV-tk2 они противоположны. Б. pBPV-tk получена путем лигирования 69T-фрагмента с большим *Hind*III-*Bam*HI-фрагментом плазмиды pAGO — производной pBR322, содержащей *Pvu*II-фрагмент (2 т.п.н.), в состав которого входит ген *tk* HSV-1 [29]. Поскольку для клонирования использовали разноименные сайты (*Hind*III и *Bam*HI), взаимная ориентация лигированных фрагментов была предопределена, направление транскрипции гена *tk* и 69T-фрагмента совпадает. ■, 69T-фрагмент BPV-1; —, плазмидная ДНК.

вышение эффективности трансформации обусловлено присутствием энхансера BPV-1 [12, 14] и не зависит от его расположения и ориентации относительно направления транскрипции гена *tk*. Такая же ситуация имеет место при трансформации плазмидой pBPV-TK клеток хомяка ВНК21, однако для мышинных L-клеток этот вывод несправедлив (табл. 6). (Удивительно, ведь сам по себе энхансер BPV увеличивает эффективность трансформации L-клеток геном *tk* приблизительно в 7 раз, даже будучи введен за 800 нуклеотидов до промотора гена *tk* [12]). Причины описанных различий неясны; возможно, они связаны с конкретными особенностями той или иной плазмиды.

В трансформированных клетках основная масса рекомбинантной плазмидной ДНК интегрируется в клеточный геном и лишь небольшая ее часть присутствует в форме эписом. Экстрахромосомные плазмиды можно «спасти» и наработать в бактериях и трансформировать ими клетки с той же эффективностью, что и исходными плазмидами [33]. Однако, в связи с тем, что только очень малая часть этих плазмид сохраняется в виде экстрахромосомных копий, их вряд ли можно рассматривать как потенциальные челночные векторы.

Таблица 6. Эффективность трансформации клеток плазмидами BPV-tk

Плаزمида	Rat 2 ¹⁾	Человеческие клетки 143 ²⁾	Мышечные L-клетки ³⁾	ВНК21 ³⁾	Источник данных
pMLTK	160	51			[14]
pMLBPVTK2	1300	131			[14]
pMLBPVTK4	400	—			[14]
pAGO			25	$2,8 \cdot 10^{-2}$	[33]
pBPV-TK			26	$7,8 \cdot 10^{-2}$	[33]

¹⁾ Число колоний на 1 мкг рекомбинантной плазмидной ДНК.
²⁾ Число колоний на 5 мкг рекомбинантной плазмидной ДНК.
³⁾ Число колоний на 1 иг рекомбинантной плазмидной ДНК.

3.2.2. Гибридные плазмиды BPV-gpt

В этих плазмидах доминантным селективным маркером служит ген *gpt* *E. coli*, который функционирует под контролем раннего транскрипционного промотора SV40 [34]. Клетки, акцептировавшие и экспрессирующие бактериальный ген, способны расти на среде НАТ (гипоксантин-аминоптерин-тимидин), содержащей ксантин и микофеноловую кислоту.

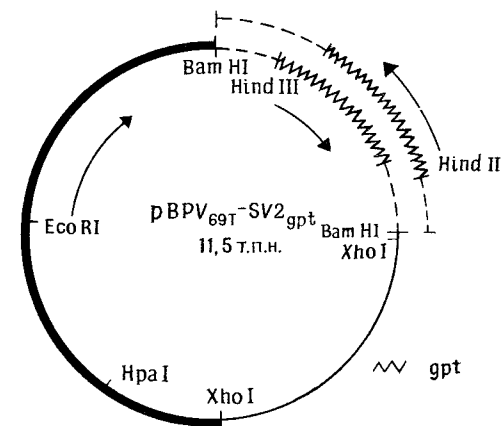


Рис. 4. Рекombинантные плазмиды BPV-1-gpt. pBPV69T-SV2gpt получена следующим образом. Сначала соединили 69T-фрагмент BPV-1 и *Eco*RI-*Sal*I-фрагмент (3,7 т.п.н.) pBR322 с помощью *Xho*I-линкеров. После конверсии *Pvu*II-сайта pSV2gpt [31] в *Bam*HI-сайт, *Bam*HI-фрагмент этой плазмиды, содержащий ген *gpt*, ввели в уникальный *Bam*HI-сайт плазмиды BPV69T. В составе pBPV69T-SV2gpt (57-5) 69T-фрагмент и фрагмент pSV2gpt находятся в одинаковой транскрипционной ориентации, а в составе pBPV69T-SV2gpt (57-1) — в противоположной ориентации. ■, 69T-фрагмент; ---, ДНК SV40; —, pBR322.

В плазмидах pBPV69T-SV2gpt ген *SV2gpt* состыкован с 69Т-фрагментом BPV-1 в обеих возможных ориентациях [35] (рис. 4). Эти плазмиды индуцируют морфологическую трансформацию мышиных клеток C127 и сообщают им способность расти на селективных средах. В подавляющем большинстве трансформированных клеточных линий экспрессируются два фенотипических маркера. Клетки, отбираемые по BPV-индуцируемой фокальной трансформации, могут расти в присутствии микофеноловой кислоты и наоборот, клетки, селектируемые по устойчивости к кислоте, не подвержены контактному торможению и способны расти в мягком агаре. Высокая частота коэкспрессии свидетельствует о том, что функциональная связь между двумя генами сохраняется независимо от их взаимной ориентации.

Следует, однако, отметить, что как и в случае плазмид BPV-tk, селекция по экспрессии гена *gpt* не решает проблемы реорганизации и интеграции плазмид BPV-gpt, что делает эти плазмиды непригодными для использования в качестве челночных векторов.

3.2.3. Плазмиды BPV, устойчивые к неомицину

Ген *neo^r*, локализованный в Tn5, обеспечивает устойчивость бактериальных клеток к канамицину, а в случае его функционирования под контролем эукариотического промотора, устойчивость клеток млекопитающих к аминогликозиду G418 [36]. Ген *neo^r*, фланкированный эукариотическим промотором и сигналом терминирования транскрипции, использовали в сочетании как с целым геномом BPV-1 [37, 38], так и с 69Т-фрагментом [39] (рис. 5).

В плазмиде pdBPV-MMTneo (342-12) ген *neo^r*, фланкированный промотором гена металлотииона 1 мыши [40] на 5'-конце и сигналами сплайсинга и терминирования транскрипции в составе малого t-антигена SV40 [41] на 3'-конце, введен в производную pdBPV-1 [25] (рис. 5А).

pCGBPV представляет собой космиду, содержащую область начала репликации ColE1 и λ cos-сайт, состыкованные с целым геномом BPV-1. Ген *neo^r* поставлен под контроль сразу двух промоторов — эукариотического (гена *tk* HSV-1) и прокариотического (промотора P1 из pBR322) [42] и, следовательно, может обеспечивать селекцию как в бактериальных клетках, так и в клетках млекопитающих. Сигналы полиаденилирования транскриптов локализованы на 3'-конце гена *tk* HSV-1 (рис. 5Б).

Плазмида pV69 содержит аналогичную транскрипционную «кассету» с *neo^r*, с той только разницей, что промотор P1 заменен на гомологичный по отношению к *neo^r* промотор из Tn5 [36]. В составе этой рекомбинантной конструкции ген *neo^r* соединен с 69Т-фрагментом BPV-1 (рис. 5В).

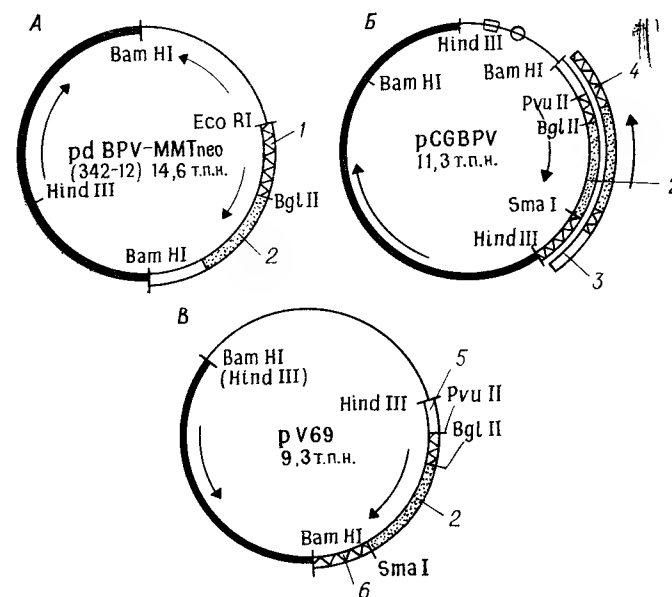


Рис. 5. Рекомбинантные плазмиды BPV-1-*neo*. А. pdBPV-MMTneo содержит: фрагмент *Bam*HI-*Hind*III плазмиды pML2 (с инвертированной дупликацией *Eco*RI-*Hind*III-сегмента длиной 29 т.п.н.), несущий ген *amp^r* и область начала репликации; сегмент *Eco*RI-*Bgl*II с промотором мышиного гена металлотииона 1 [40]; сегмент *Bgl*II-*Xho*I, включающий структурную часть гена *neo^r*, в котором отсутствует сайт *Sall*; фрагмент SV40 (850 п.н.), несущий сигналы сплайсинга и 3'-концевые сигналы терминирования транскрипции малого t-антигена [41]; сегмент *Bam*HI-*Bam*HI, включающий полный геном BPV-1. ■, BPV-1; 1 — промотор MMT; 2 — ген *neo^r*; □, SV40; —, pML2. Б. pCGBPV содержит: сегмент, включающий область начала репликации ColE1 и λ cos-сайт; промотор P1 pBR322 [42]; промотор и сигналы полиаденилирования транскрипта *tk* HSV-1 [31], фланкирующие ген *neo^r* Tn5; сегмент *Hind*III-*Hind*III, включающий полный геном BPV-1. В pCGBPV7 направление транскрипции гена *neo^r* совпадает с направлением транскрипции ДНК BPV-1, а в pCGBPV9 их транскрипция происходит в противоположных направлениях. ■, BPV-1; ○, область начала репликации ColE1; □, λ cos; 3 — промотор P1 pBR322; 4 — промотор и сигналы полиаденилирования *tk* HSV-1. В. pV69 содержит: ген *amp^r* и область начала репликации pBR322; промотор *neo^r* Tn5 [36]; промотор и сигналы полиаденилирования транскрипта гена *tk* HSV-1, фланкирующие ген *neo^r*; 69Т-фрагмент BPV-1. *Hind*III-сайт в ДНК BPV-1 конвертирован сайт *Bam*HI. Стрелками показано направление транскрипции ДНК BPV-1 и гена *neo^r*. ■, 69Т-фрагмент BPV-1; —, pBR322; 5 — промотор *neo^r*; 6 — промотор и сигналы полиаденилирования *tk* HSV-1.

Таблица 7. Трансформация мышинных клеток C127 плазмидами BPV-нео^r

Плазмида	Колонии G418	Количество фокусов	Источник данных
pdMMTneo (302-3)	9 ¹⁾	0 ¹⁾	[37]
pdBPV-MMTneo (342-12)	30 ¹⁾	6 ¹⁾	[37]
pAG60	510 ²⁾	0 ²⁾	[38]
pCGBPV7	3441 ²⁾	176 ²⁾	[38]
pCGBPV9	4529 ²⁾	573 ²⁾	[38]
pAG60	392 ¹⁾	—	[39]
pV69	550 ¹⁾	20 ³⁾	[39]

¹⁾ Эффективность трансформации выражена числом устойчивых к G418 колоний и количеством трансформированных фокусов в расчете на 1 мкг плазмидной ДНК.

²⁾ Эффективность трансформации выражена числом устойчивых к G418 колоний и количеством трансформированных фокусов в расчете на 1 пикомоль плазмидной ДНК.

³⁾ Число фокусов трансформации, полученных в результате посева в нормальной среде 500 устойчивых к G418 клеток, вместе с $5 \cdot 10^6$ нетрансформированных клеток C127.

При введении этих плазмид в мышинные клетки C127 они индуцируют формирование колоний, устойчивых к G418, а также морфологически трансформированных фокусов (табл. 7). Эффективность трансформации по устойчивости к G418 превышает эффективность трансформации тех же клеток соответствующими родительскими плазмидами, что, вероятно, объясняется присутствием энхансера BPV-1 [12, 14]. Количество устойчивых к G418 колоний всегда больше, чем количество трансформированных фокусов (табл. 7), и большая их часть имеет фенотип нормальных фибробластов. Вместе с тем, при дальнейшем культивировании эти клетки приобретают полностью трансформированный фенотип. Методика селекции по устойчивости к G418 описана в гл. 6.

Трансформированные pdBPV-MMTneo клетки также обнаруживают устойчивость к G418 [37], в то время как многие фокусы, индуцированные плазмидами pCGBPV и pV69 чувствительны к этому препарату и содержат плазмидную ДНК с делецией (см. ниже) [38, 39]. Причины этого явления неизвестны.

В клеточных линиях, отобранных по устойчивости к G418, (а в случае pdBPV-MMTneo также и по признаку морфологической трансформации) плазмиды присутствуют в виде множественных мономерных эписомов в количестве 20—100 копий. Эти плазмиды можно «спасать» и нарабатывать в бактериях; их структура оказывается идентичной исходным плазмидам. Любо-

пытным исключением является плазида pCGBPV7, которую в трансформированных клетках можно обнаружить главным образом во фракции высокомолекулярной ДНК [38]. Пока остается непонятным различие в поведении pCGBPV7 и pCGBPV9; не исключено, что оно связано с тем, что направление транскрипции ДНК BPV-1 и гена *нео^r* совпадает в плазмиде pCGBPV7, а в плазмиде pCGBPV9 — противоположно (рис. 5Б).

В клеточных линиях, отобранных по признаку морфологической трансформации, плазмиды также присутствуют в виде множественных экстрахромосомных копий, однако здесь они обнаруживают перестройки и делеции, затрагивающие преимущественно бактериальные последовательности [38, 39]. Как мы уже упоминали, плазида pdBPV-MMTneo представляет собой исключение, поскольку в морфологически трансформированных клетках она сохраняется в неизменном виде и может быть выделена и наработана в бактериальных клетках [37].

Учитывая способность плазмиды BPV-нео к экстрахромосомному существованию, следует признать ее наиболее перспективной для использования в качестве эукариотического челночного вектора, обеспечивающего возможность двойной селекции. Замедленное проявление признаков полной малигнизации у клеток, устойчивых к G418 — весьма интересный феномен. Его можно объяснить необходимостью достижения порогового уровня либо в числе копий генома BPV-1 в клетке, либо в количестве BPV-специфичных трансформирующих продуктов (либо и в том и в другом одновременно). Весьма вероятно, что такие клетки находятся на разных стадиях трансформации. Этот процесс постепенно углубляется и завершается полной малигнизацией, когда накапливается достаточное количество вирусных продуктов или когда устанавливается функциональное взаимодействие этих продуктов с неизвестными пока клеточными факторами.

3.3. Эукариотические гены в BPV-векторах

Для того, чтобы выступать в роли векторов для молекулярного клонирования, BPV-плазмиды должны удовлетворять определенным требованиям. В частности, они должны обладать способностью к экстрахромосомному существованию, эффективно нарабатываться в бактериальных клетках и обеспечивать регулируемую экспрессию и полноценную транскрипцию клонированных генов. На сегодняшний день в BPV-векторах клонированных генов (табл. 8). Соответствующие рекомбинантные конструкции присутствуют в трансформированных клетках главным образом в виде эписомов; в целом клонированные гены правильно транскрибируются и экспрессируются.

Таблица 8. Эукариотические гены, клонированные в BPV-векторах

Рекомбинантные плазмиды	BPV	Эукариотический ген	Размер клонированного гена, т. п. н.	Последовательности pBR ¹⁾	Рисунок	Источник данных
pBPV69T-rI1	69T	Препроинсулин крысы	1,62	—	6	[43]
pBPV-β	69T	β-Глобин человека	7,6	+	7	[46]
pGP	69T	Гормон роста крысы	5,8	+	8А	[48]
pBPVMG	69T	Гормон роста человека плюс промотор гена металлотинонеина мыши	3,5	—	8Б	[49]
pBPV69T-IFNβ1	69T	β-Интерферон человека	1,6	—	9А	[52]
pBPV-IF	69T	β-Интерферон человека	1,6	—	9Б	[53]
pM18/19	69T	MMTVLTR + H-MSV v-gas	3,7	—	10	[55]
pBPV-βHLA	69T	Тяжелая цепь HLA 8,5+7,6 плюс β-глобин человека	8,5+7,6	+	11	[56]
pM26V4	Полный геном	Поверхностный антиген HBV	2,7	—	12	[57]

¹⁾ Показано наличие (+) или отсутствие (—) плазмидных последовательностей в составе рекомбинантной конструкции.

3.3.1. Физическая организация

Во всех случаях, за исключением гена поверхностного антигена вируса гепатита В (HBVsAg) для клонирования перечисленных генов использовали 69T-фрагмент BPV (табл. 8). Размер клонированных эукариотических последовательностей варьировал от 1,6 т. п. н. в случае гена препроинсулина крысы (rI1) и гена β-интерферона человека (IF) в составе плазмид pBPV69T-rI1 и pBPV-IF соответственно [43, 52, 53] (рис. 6 и рис. 9) до 16,1 т. п. н. Именно таков суммарный размер клонированного в составе плазмиды pBPV-βHLA фрагмента, который включает β-глобиновый ген человека длиной 7,6 т. п. н. (рис. 7) и ген HLA человека, имеющий длину 8,5 т. п. н. (рис. 11) [56].

Большинство генов было клонировано в обеих ориентациях относительно направления транскрипции BPV-последовательностей; некоторые гены клонировали только в одной заранее определенной ориентации благодаря подбору рестриктаз (см. рис. 6, 8А и 9Б).

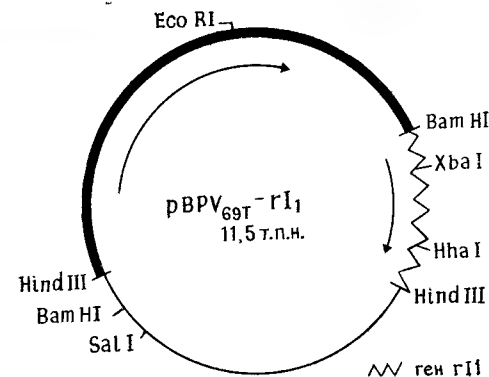


Рис. 6. Ген препроинсулина крысы в BPV-плазмиде. В *Bam*HI-*Hinc*II фрагменте (1,6 т.п.н.), содержащем кодирующие последовательности гена препроинсулина крысы (rI1), а также его интронные участки и 5'- и 3'-концевые регуляторные сигналы [44], *Hinc*II-сайт был конвертирован в сайт *Hind*III с помощью *Hind*III-линкеров. Модифицированный таким образом фрагмент лигировали с 69T-фрагментом вируса бычьей папилломы (BPV) и получившийся гибридный сегмент BPV69T-rI1 ввели в сайт *Hind*III-плазмиды pBR322. Перед тем, как трансформировать клетки C127, плазмидные последовательности удаляли из pBPV69T-rI1 с помощью рестриктазы *Hind*III. Эффективность трансформации гибридной ДНК составляла ~200 фокусов/мкг ДНК. ■, BPV69T; —, pBR322.

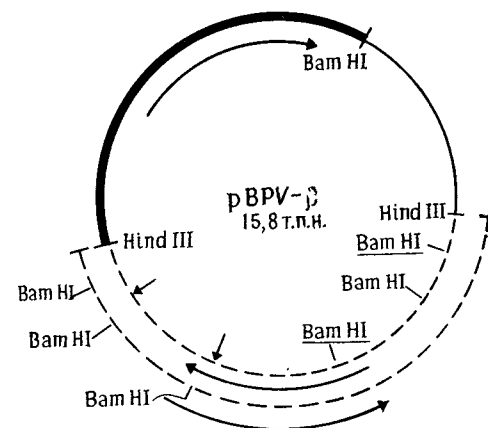


Рис. 7. Ген β-глобина человека в BPV-плазмиде. *Hind*III-фрагмент (7,6 т.п.н.) β-глобинового кластера человека [45] в обеих ориентациях был введен в сайт *Hind*III плазмиды pBPV-H11 (гибрид pML2-BPV69T); рекомбинантные конструкции получили обозначение pBPV-β. В pBPV-β1 транскрипционная ориентация ДНК BPV и глобинового гена одна и та же, а в pBPV-β3 — противоположная. Эффективность трансформации pBPV-β составляла ~400 фокусов/мкг вирусной ДНК. ■, BPV69T; —, pML2; ---, последовательности β-глобинового гена. Два подчеркнутых *Bam*HI-сайта и две маленьких стрелки над β-глобиновой последовательностью указывают границы делеции в мутантной плазмиде, использованной для клонирования гена β-интерферона человека (см. текст).

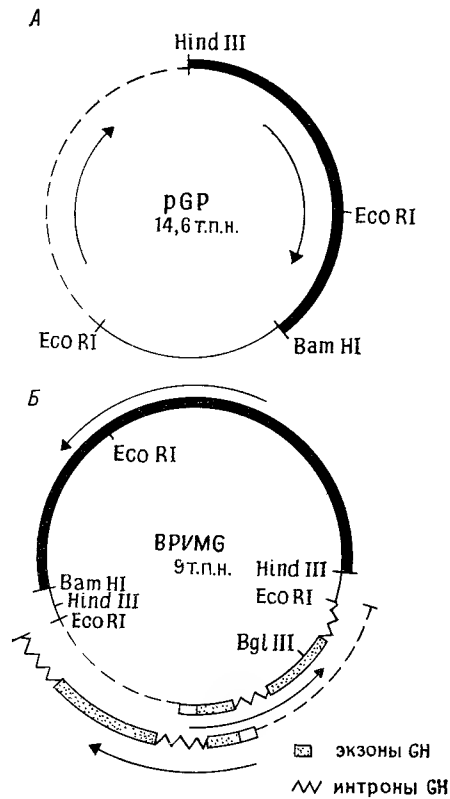


Рис. 8. Гены гормона роста в векторах на основе вируса бычьей папилломы (BPV-векторах). А. рGP получен путем лигирования *EcoRI-HindIII*-фрагмента ДНК крысы (5,8 т.п.н.), содержащего ген гормона роста [47], с большим *EcoRI-HindIII*-фрагментом плазмиды рBR327 и последующего введения фрагмента BPV69T между сайтами *HindIII* и *BamHI*. Эффективность трансформации составляет ~25 фокусов/мкг ДНК. ■, BPV69T; —, рBR327; ---, ген гормона роста крысы. Б. BPVMG получена с использованием *BamHI*-фрагмента, содержащего часть геномной последовательности и часть кДНК гена гормона роста человека [50]. Этот фрагмент ввели в сайт *BglIII* 5'-нетранслируемой зоны гена металлотioneина мыши (MT) [51]. Гибридный ген MT-GH был выделен в составе *HindIII*-фрагмента и затем введен в *HindIII*-сайт рBPV69T. Плазмидные последовательности удалили с помощью рестриктазы *BamHI*, после чего сегмент BPV-MT-GH был рециклизован путем лигирования и использован для трансформации клеток C127. Таким образом, плазмида BPVMG кроме 69T-фрагмента содержит 5'-фланкирующие последовательности гена MT (1,6 т.п.н.), 5'-нетранслируемую последовательность MT (68 п.н.), первый экзон гена GH (70 п.н.), интрон GH (250 п.н.), структурную последовательность GH (750 п.н.), 3'-нетранслируемую зону GH (450 п.н.). Направление транскрипции BPV и GH одинаково в плазмиде BPVMG7 и противоположно — в BPVMG6. ■, BPV69T; ---, 5'-фланкирующие последовательности MT; □, 5'-нетранслируемый лидер MT.

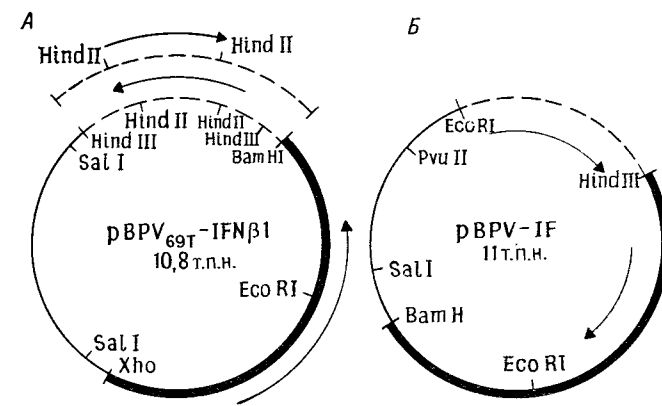


Рис. 9. Ген β -интерферона человека в BPV-плазидах. А. рBPV69T-IFN β 1; *HindIII*-фрагмент ДНК (1,6 т.п.н.), содержащий ген β -интерферона и *EcoRI-HindIII*-фрагмент рBR322 (28 п.н.), был введен в обеих ориентациях в сайт *HindIII* векторной молекулы рBPV69T, содержащей модифицированный *SalI-SalI*-фрагмент (3,7 т.п.н.) плазмиды рBR322. В рBPV69T-IFN β 1 117—13 транскрипционная ориентация BPV и гена интерферона одинакова; в рBPV69T-IFN β 1 117—211 — противоположная [52, 53]. Б. рBPV-IF; ген β -интерферона человека (1,6 т.п.н.) клонирован в виде *EcoRI-HindIII*-фрагмента в делеционном мутанте рBR322, утратившем «токсичную» последовательность; эта конструкция получила обозначение рIFR. *HindIII-BamHI* 69T-фрагмент лигировали с рIFR, обработанной рестриктазами *HindIII* и *BamHI*; полученная конструкция была обозначена как рBPV-IF. Направление транскрипции гена интерферона и ДНК BPV совпадает. Перед трансфекцией плазмидные последовательности удаляли рестриктазами: в случае рBPV69T-IFN — *SalI*, а в случае рBPV-IF — *SalI* и *PvuII*. ■, BPV69T; ---, ген β -интерферона; —, рBR322.

3.3.2. Эффективность трансформации

Известно, что последовательности плазмидной ДНК ингибируют трансформацию клеток 69T-фрагментом BPV (см. разд. 3.1. и табл. 3). Вот почему перед тем, как ввести гибридную ДНК в клетки C127, эти последовательности удаляли с помощью рестриктаз. Для трансфекции использовали как линейные молекулы, так и молекулы, рециклизованные путем лигирования, например, в случае плазмид BPVMG (см. рис. 8 Б) [49]. Линейные молекулы при попадании в клетку подвергались естественной рециклизации (см. раздел 3.3.3.) и зачастую утрачивали рестрикционный сайт, как например BPV69T-r11 [43] (см. рис. 6).

В случае плазмид рBPV- β [46] и рGP [48] удаление ингибирующих плазмидных последовательностей не является обязательным условием для эффективной трансформации клеток. Эти

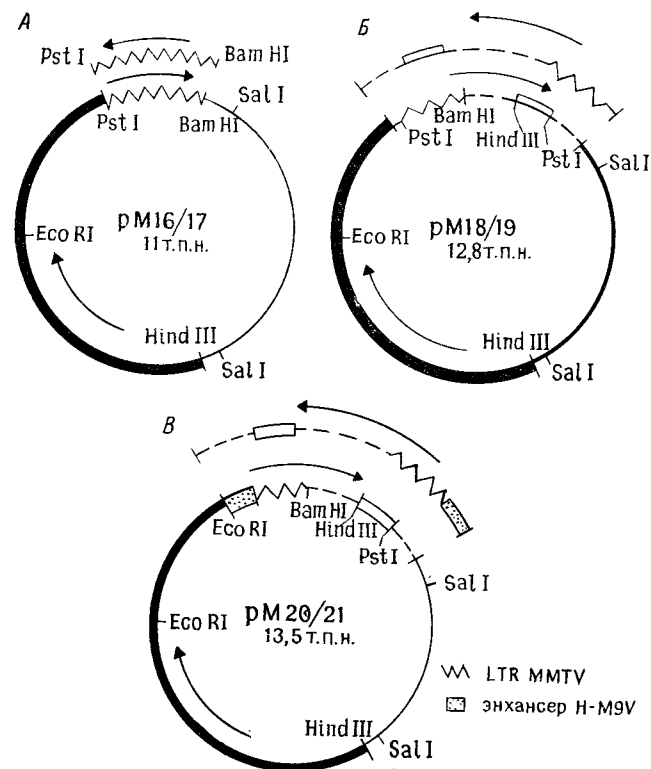


Рис. 10. Гибридные плазмиды BPV-MMTV LTR. Все плазмиды этой серии содержат 69Т-фрагмент BPV и модифицированную плазмидную последовательность pBR322, в которой *EcoRI*-сайт конвертирован в сайт *SalI*. А. pM16 и pM17 содержат LTR MMTV (1,3 т.п.н.), соответственно, в прямой и обратной транскрипционной ориентации относительно ДНК BPV. Б. pM18 и pM19 содержат ген *v-ras* H-MSV, состыкованный с 3'-концом LTR MMTV. В pM18 направление транскрипции *v-ras* и ДНК BPV совпадает; в pM19 их транскрипция происходит в противоположных направлениях. В. pM20 и pM21 включают фрагмент (700 п.н.), содержащий энхансер (72 п.н.) H-MSV, состыкованный с 5'-концом MMTV LTR. В pM20 направление транскрипции *v-ras* и ДНК BPV совпадает; в pM21 они транскрибируются в противоположных направлениях. После удаления pBR322 с помощью *SalI* гибридная ДНК была использована для трансфекции как в линейной форме, так и после рециклизации путем лигирования. Эффективность трансформации рециклизованной ДНК составляет от 3000 до 7000 фокусов на 1 мкмоль ДНК. ■, BPV69Т; —, pBR322; □, ген H-MSV *v-ras*; ---, 5'- и 3'-фланкирующие последовательности.

плазмиды содержат, соответственно, β -глобиновый ген человека и ген гормона роста (GH) крысы; предполагается, что их высокая трансформирующая способность — результат малопонятного стабилизирующего эффекта вставочной ДНК.

Эффективность трансформации варьирует от 10 фокусов на 1 мкг ДНК в случае pM26V4 [57] до 400 в случае pBPV- β [46]. Остается неясным, связаны ли наблюдаемые различия в эффективности трансформации с индивидуальными структурными особенностями плазмид или же они обусловлены различиями в применяемых методиках трансфекции, и разной компетентностью реципиентных клеток.

3.3.3. Интеграция в хозяйский геном

Большинство BPV-рекомбинантов присутствует в трансформированных клетках в виде множественных кольцевых эписом; их число варьирует от 100 до 200 копий на клетку в различных клеточных линиях. pBPV- β и pGP сохранили в своем составе плазмидные последовательности, благодаря чему их можно «спасать» и нарабатывать в *E. coli* в форме интактных мономерных эписом [46, 48]. В то же время некоторые другие гибридные плазмиды подвергаются в клетке реорганизации и(или) интегрируются в хозяйский геном.

Так например, BPV69Т-IFN β 1 и BPV-IF, которые несут ген β -интерферона человека (рис. 9), несмотря на то, что размножаются как эписомы, имеют в своем составе чужеродные последовательности ДНК, заимствованные либо из хозяйского генома, либо из ДНК, используемой в качестве носителя, и в некоторых линиях клеток присутствуют исключительно в мультимерной форме [52, 53]. Точно так же в pM2 6V4, которая содержит ген sAg HBV (см. рис. 12), наблюдаются различного рода перестройки, включая делеции и инсерции [57].

Плазмиды pM20 и pM21 (рис. 10 В), в противоположность другим представителям этих же серий (см. разд. 3.3.4), обнаруживаются почти всегда в виде интегрированных копий, претерпевших различные перестройки; количество копий этих плазмид в клетке ниже, чем количество копий сестринских плазмид [55]. Причины отмеченных различий неясны; возможно, они связаны с присутствием 72-нуклеотидного энхансера вируса саркомы мышей Харви (H-MSV).

Плазмида pBPV- β HLA (рис. 11) в трансформированных клетках также существует в виде высокомолекулярных структур, образованных интегрированными tandemно повторяющимися копиями. Интеграция может быть обусловлена большим размером плазмиды, может происходить вследствие гомологичной рекомбинации с мышиными генами H2 или благодаря каким-то другим неизвестным факторам.

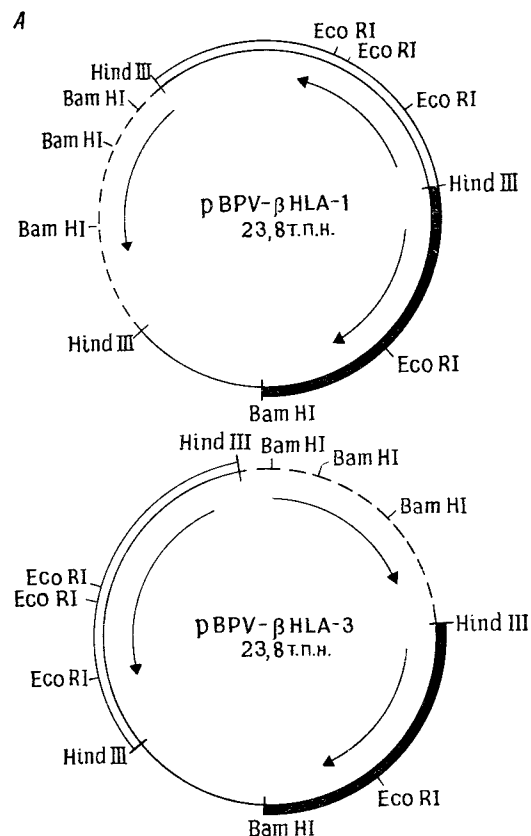


Рис. 11. Ген тяжелой цепи HLA человека в BPV-β-глобиновом векторе. *Hind*III-фрагмент (8,5 т.п.н.), содержащий ген тяжелой цепи HLA человека, лигирован с pBPV-H11, обработанной рестриктазой *Hind*III. Полученная плазмида была подвергнута неполному гидролизу *Hind*III; полноразмерные линейные молекулы лигировали с *Hind*III-фрагментом (7,6 т.п.н.) β-глобинового кластера человека. Одна из конструкций получила обозначение pBPV-β HLA-1 (А); в ней направление транскрипции гена HLA совпадает с таковым β-глобинового гена, но противоположно по отношению к ДНК BPV. В другой конструкции — pBPV-β HLA-3 (Б), транскрипционная ориентация HLA противоположна ориентации как β-глобинового гена, так и ДНК BPV. Ген β-глобина человека был введен в состав рекомбинантной конструкции BPV-HLA для стабилизации BPV-плазмиды ([46]; см. разд. 3.2.2). Эффективность трансформации pBPV-β HLA составляет ~150 фокусов/мкг ДНК. ■, BPV69T; □, ген тяжелой цепи HLA; ---, последовательность β-глобинового гена; —, pBR322.

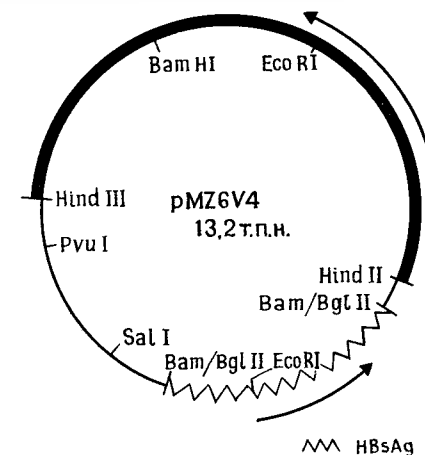


Рис. 12. Ген поверхностного антигена HBV в BPV-плазмиде. *Bgl*II-фрагмент ДНК HBV (2,7 т.п.н.), содержащий ген поверхностного антигена (sAg) и его предполагаемую промоторную последовательность [58] ввели в *Bam*HI-сайт pML2; в *Hind*III-сайт этой же плазмиды ввели линейаризованную полноразмерную ДНК BPV-1. В полученной рекомбинантной плазмиде pM26V4 направление транскрипции гена sAg такое же, как ДНК BPV. Перед трансфекцией плазмидные последовательности удаляли с помощью рестриктаз *Sal*I и *Pvu*II. Эффективность трансформации составляла 10 фокусов/мкг ДНК. ■, ДНК BPV; —, pML2.

3.3.4. Экспрессия клонированных генов

Все эукариотические гены, клонированные в векторах на базе BPV, находятся под контролем либо своих собственных транскрипционных промоторов, либо гетерологичных регулярных элементов. Ни один из клонированных генов не контролируется промоторными последовательностями BPV.

1. *Неиндуцибельные гены.* Гены препроинсулина крысы, β-глобина человека, гены HLA и ген sAg HBV надлежащим образом транскрибируются и экспрессируются в клетках, трансформированных соответствующими BPV-рекомбинантами. Инсулиновая мРНК правильно транслируется в препроинсулин, который в свою очередь процессируется с образованием проинсулина. Проинсулин выходит в среду культивирования. В то же время очередная стадия созревания, а именно превращение проинсулина в инсулин, в клетках C127 не происходит — вероятно, в связи с отсутствием необходимых ферментов [43]. β-Глобиновая мРНК правильно сплайсируется и полиаденилируется, однако β-глобин в трансформированных клетках не идентифицируется. Не исключено, что это связано с нестабильностью глобиновых белков в неэритроидных клетках [46]. Ген HLA также эффективно транскрибируется; в этом случае происходит синтез

больших количеств тяжелых цепей, и какая-то часть специфического белка человека обнаруживается на клеточной поверхности в виде ассоциатов с мышинным β -микроглобулином [56]. Несмотря на обширные перестройки, обнаруженные в гибридной ДНК BPV-HBV, ген sAg экспрессируется правильно [57]. Трансформированные клетки продуцируют и секретируют HBsAg-частицы, неотличимые от 22нм-частиц, которые присутствуют в сыворотке больных, пораженных HBV. Это означает, что в данной системе белок надлежащим образом синтезируется, гликозилируется, собирается и секретируется. Отметим, что структура мРНК sAg пока остается неизученной.

2. *Индукцибельные гены.* BPV-векторы использовали также для изучения экспрессии генов, регулируемых специфическими индукторами. В случае гена гормона роста крысы, клонированного в составе рGP (рис. 8), оказалось, что его экспрессия в трансформированных мышинных клетках носит конститутивный характер и не реагирует на глюкокортикоиды [48]. Потеря индукцибельности может быть связана с неправильной инициацией транскрипции гена, поскольку синтезируемая трансформантами мРНК оказывается примерно на 200 нуклеотидов длиннее, чем аутентичная мРНК GH. В плазмиде рBPVMG (рис. 8Б) человеческий мини-ген GH состыкован с промотором металлотионеинового гена [49]. Обработка трансформированных рBPVMG клеток кадмием приводила как к повышению уровня гибридной мРНК MT-GH (от 2 до 7 раз), так и к увеличению количества секретируемого GH (в 2 раза). В то же время, при обработке дексаметазоном такого эффекта не было. Следовательно, можно предположить, что регуляция металлотионеинового гена металлами и гормонами осуществляется посредством различных механизмов и что, по крайней мере, один из них не работает в паре с клонированными регуляторными последовательностями. Когда клетки, трансформированные BPV-рекомбинантами, содержащими длинный концевой повтор (LTR) вируса рака молочной железы мышей (MMTV) (рис. 10), выращивали в присутствии дексаметазона, уровень мРНК *v-gas*, транскрибируемой под контролем глюкокортикоид-зависимого промотора, возрастал в 30—100 раз по сравнению с неиндуцированными клетками. Это подтверждает сделанный на основании предшествующих наблюдений вывод о том, что длинный концевой повтор MMTV служит мишенью для глюкокортикоидной индукции, и эта роль LTR сохраняется даже в том случае, когда он находится в составе эписомы (будучи отделен от возможных контролирующих клеточных последовательностей, фланкирующих его в геноме).

Клетки, трансформированные рекомбинантными плазмидами BPV-IF [52, 53] (рис. 9), конститутивно продуцируют человеческий β -интерферон и отвечают на индукцию как инактивированным вирусом Ньюкаслской болезни, так и *poly(I)·poly(C)*.

Индукция приводит к 32-кратному повышению уровня мРНК β -IF человека, а количество продуцируемого человеческого β -интерферона увеличивается в 120 раз. По-видимому, конститутивные транскрипты иницируются неправильно. Не так давно были локализованы и идентифицированы два контролирующих элемента, которые управляют экспрессией гена β -интерферона человека [54]. Один из них расположен в области —77 —19 относительно *cap*-сайта и определяет как конститутивную, так и индуцированную экспрессию β -IF. Другой элемент находится в области —210 —107; при утрате этого элемента (в результате делеции) уровень конститутивных транскриптов возрастал приблизительно в 10 раз, в то время как количество индуцированных мРНК β -IF оставалось без изменения.

4. Заключение

Несмотря на успешное использование ДНК BPV-1 в качестве эукариотического вектора для молекулярного клонирования, некоторые его биологические свойства остаются неизученными.

ДНК BPV-1 или его векторных производных присутствует в трансформированных клетках в форме множественных эписом; количество их копий варьирует в зависимости от типа клеток от 20 до 300. В то же время, в клетках данной линии количество эписом сохраняется постоянным на протяжении длительного времени. Поскольку минихромосомы BPV не содержат центромер, их сегрегация и распределение по дочерним клеткам, вероятнее всего, происходит случайным образом и, следовательно, количество их копий в клетке — величина случайная. Однако факторы (если таковые имеются), определяющие представленность эписом в данной клетке и способствующие поддержанию постоянного среднего числа копий в данной клеточной линии, неизвестны. Кроме того неизвестно, реплицируется ли ДНК BPV на какой-то определенной стадии клеточного цикла, или же ее синтез может происходить в любой момент.

Неясно также, почему для осуществления эффективной клеточной трансформации необходимо отделить 69Т-фрагмент от вектора (это условие необязательно только в случае плазмиды рAT153) и в то же время введение в рекомбинантные плазмиды фрагментов β -глобинового гена человека или гена гормона роста крысы обуславливает трансформирующую способность этих плазмид в интактной форме.

Когда в BPV-векторы вводят доминантные маркеры и трансформантов отбирают, например, по экспрессии генов *th* или *gpt*, BPV-плазмиды обнаруживаются в этих клетках в интегрированной форме. В то же время, в клетках, отобранных по устойчивости к неомицину, они существуют в виде множественных эписом.

Можно ли из этого факта сделать вывод, что для успешной экспрессии генов *tk* и *gpt* необходимо присутствие рядом с ними контролирующих клеточных элементов? Ответ на данный вопрос может дать анализ клеточных последовательностей в участках интеграции рекомбинантных плазмид.

Еще одним загадочным свойством BPV-плазмид является их способность приобретать новые последовательности ДНК; особенно часто это наблюдается при использовании 69T-фрагмента. Можно предположить, что для эффективной репликации плазмиды необходим определенный минимальный ее размер. С другой стороны, загадочная способность приобретать новые последовательности может быть и следствием происходящих в клетке рекомбинационных событий.

Еще более непонятен тот факт, что весьма близкие в структурном отношении рекомбинантные плазмиды ведут себя по-разному. Наиболее ярким примером могут служить rCGBPV7 и rCGBPV9: первая интегрируется в геном трансформированной клетки, а вторая существует как автономный репликон. Разница между двумя плазмидами заключается в различной взаимной ориентации составляющих их структурных элементов. В первом случае транскрипция последовательностей Tn5 и BPV односторонняя, тогда как во втором случае она происходит в разных направлениях. Поскольку структура мРНК, транскрибируемых на матрицах этих плазмид неизвестна, вопрос о том, влияет ли характер транскрипции (и если да, то каким образом) на их внутриклеточное поведение, остается открытым.

Несмотря на отмеченные трудности, именно с помощью векторов BPV были клонированы многие эукариотические гены и однозначно идентифицированы регуляторные элементы индуцибельных генов (в частности, речь идет об изящной работе, посвященной гену β -интерферона человека). В дальнейшем можно планировать изучение взаимодействий этих элементов с контролирующими факторами, что позволит расширить и углубить наши представления о механизмах индукции генов.

Правильная экспрессия генов, клонированных в векторах на базе BPV, делает эту векторную систему применимой не только в области «чистой» науки, но и в сфере прикладных исследований. Так, введение в клетки млекопитающих нескольких копий гена поверхностного антигена HBV и осуществление их правильной транскрипции и последующей модификации синтезируемых продуктов послужило бы важным вкладом в дело создания противовирусной вакцины.

Как мы уже говорили, не все рекомбинантные плазмиды присутствуют в клетке в виде эписом — некоторые из них интегрируются в геном, что, по-видимому, связано с их крупными размерами (например, HLA-плазмиды). Способность большинства BPV-нео-плазмид существовать в форме эписом и обеспе-

чивать челночную векторную связь между эукариотическими и прокариотическими клетками делает их особенно удобными в практической работе. Можно получить неомициностойчивые рекомбинантные плазмиды, в которых присутствуют только BPV-детерминанты, необходимые для автономной плазмидной репликации. Такие рекомбинантные конструкции имеют меньший размер и поэтому способны включать в свой состав более крупные фрагменты ДНК; их можно эффективно размножать в клетках, селективируемых по устойчивости к G418.

Дальнейшее углубление наших знаний о функциональной организации генома BPV несомненно будет способствовать не только исследованиям в области вирусологии, но и разработке новых эукариотических векторных систем с улучшенными характеристиками.

Благодарности

Мы благодарим Д. ДиМайо, предоставившего в наше распоряжение неопубликованные данные, К. Смита, который взял на себя труд критически просмотреть рукопись, Р. Форбес, оказавшую нам неоценимую секретарскую помощь, и Д. Таллака, выполнившего фотографические работы. Собственные научные изыскания автора настоящей статьи проводились под эгидой Совета по раковым исследованиям (CRC).

Литература

1. Rigby P. W. J. In: Genetic Engineering, Williamson R. (ed.), Academic Press, Vol. 3, p. 83 (1982).
2. Lancaster W. D., Olson C. Microbiological Reviews, 46, 191 (1982).
3. Pfister H. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol., 99, 112 (1984).
4. Chen E. Y., Howley P. M., Levinson A. D., Seeburg P. H. Nature, 299, 529 (1982).
5. Lancaster W. D. J. Virol., 32, 684 (1979).
6. Campo M. S., Moar M. H., Laird H. M., Jarrett W. F. H. Virology, 113, 213 (1981).
7. Morgan D. M., Murphy M. E., Abraham J. M., Meinke W. J. J. Gen. Virol., 56, 213 (1981).
8. Ammann E., Sauer G. J. Virol., 43, 59 (1982).
9. Heilman C. A., Engel L. W., Lowy D. R., Howley P. M. Virology, 119, 22 (1982).
10. Engel L. W., Heilman C. A., Howley P. M. J. Virol., 47, 516 (1983).
11. Rosl F., Waldek W., Sauer G. J. Virol., 46, 567 (1983).
12. Campo M. S., Spandidos D. A., Lang J., Wilkie N. M. Nature, 303, 77 (1983).
13. Nakabayashi Y., Chattopadhyay S. K., Lowy D. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5832 (1983).
14. Lusky M., Berg L., Weiher H., Botchan M. Mol. Cell Biol., 3, 1108 (1983).
15. Lowy D. R., Dvoretzky I., Shober R., Law M. F., Engel L., Howley P. M. Nature, 287, 72 (1980).
16. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory

- Manual, published by Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. [Имеется перевод: Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984.]
17. Bolivar F., Rodriguez R., Green P. J., Betlach M., Heyneker H. L., Boyer H. W., Crosa J., Falkow S. *Gene*, **2**, 95 (1977).
 18. Twigg A. J., Sherratt D. *Nature*, **283**, 216 (1980).
 19. Soberon X., Covarrubias L., Bolivar F. *Gene*, **9**, 287 (1980).
 20. Lusky M., Botchan M. *Nature*, **293**, 79 (1981).
 21. Howley P. M., Law M. F., Heilman C., Engel L., Alonso M. C., Israel M. A., Lowy D. R., Lancaster W. D. In: *Viruses in Naturally Occurring Cancers*, Essex M., Todaro G., zur Hans H. (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 233, 1980.
 22. Campo M. S., Spandidos D. A. J. *Gen. Virol.*, **64**, 549 (1983).
 23. Law M. F., Lowy D. R., Dvoretzky I., Howley P. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2727 (1981).
 24. Binetruy B., Meneguzzi G., Breathnach R., Cuzin F. *EMBO J.*, **1**, 621 (1982).
 25. Sarver N., Byrne J. C., Howley P. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 7147 (1982).
 26. Campo M. S., Coggins L. W. J. *Gen. Virol.*, **63**, 255 (1982).
 27. Graham F. L., Van Der Eb A. J. *Virology*, **54**, 536 (1973).
 28. Frost E., Williams J. *Virology*, **91**, 39 (1978).
 29. Sutcliffe J. G. *Nucleic Acids Res.*, **5**, 2721 (1978).
 30. Hirt B. J. *Mol. Biol.*, **26**, 365 (1967).
 31. McKnight S. L., Gavis E. R., Kingsbury R., Axel R. *Cell*, **25**, 385 (1981).
 32. Colbere-Garapin F., Chousterman S., Horodiceanu F., Kourilsky P., Gerapin A. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3755 (1979).
 33. Sekiguchi T., Nishimoto T., Kai R., Sekiguchi M. *Gene*, **21**, 267 (1983).
 34. Mulligan R. C., Berg P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2072 (1981).
 35. Law M. F., Howard B., Sarver N., Howley P. M. In: *Eukaryotic Viral Vectors*, Gluzman Y. (ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, p. 79, 1982.
 36. Colbere-Gerapin F., Horodiceanu F., Kourilsky P., Gerapin C. A. J. *Mol. Biol.*, **105**, 1 (1981).
 37. Law M. F., Byrne J. C., Howley P. M. *Mol. Cell Biol.*, **3**, 2110 (1983).
 38. Mathias P. D., Bernard H. V., Scott A., Brady G., Hashimoto-Gato T., Schütz G. *EMBO J.*, **2**, 1487 (1983).
 39. Meneguzzi G., Binetruy B., Grisoni M., Cuzin F. *EMBO J.*, **3**, 365 (1984).
 40. Pavlakis G. N., Hamer D. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 397 (1983).
 41. Mulligan R. C., Berg P. *Science (Wash.)*, **209**, 1422 (1980).
 42. Stuber D., Mujard H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 167 (1981).
 43. Sarver N., Gruss P., Law M. F., Khoury G., Howley P. *Mol. Gen. Biol.*, **1**, 486 (1981).
 44. Lomedico P., Rosenthal N., Efstratiadis A., Gilbert W., Kolodner R., Tizard R. *Cell*, **18**, 545 (1979).
 45. Fritsch E. F., Lawn R. M., Maniatis T. *Cell*, **19**, 959 (1980).
 46. DiMaio D., Treisman R., Maniatis T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4030 (1982).
 47. Page G. S., Smith S., Goodman H. M. *Nucleic Acids Res.*, **9**, 2087 (1981).
 48. Kushner P. J., Levinson B. B., Goodman H. M. *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**, 527 (1982).
 49. Pavlakis G. N., Hamer D. H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 397 (1983).
 50. Martial J. A., Hallewell R. A., Baxter J. D., Goodman H. M. *Science (Wash.)*, **205**, 602 (1979).
 51. Hamer D. H., Walling M. J. *J. Mol. Appl. Genet.*, **1**, 273 (1982).
 52. Mitrani-Rosenbaum S., Maroteaux L., Mory Y., Revel M., Howley P. M. *Mol. Cell Biol.*, **3**, 233 (1983).
 53. Zinn K., Mellon P., Plashne M., Maniatis T. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4897 (1982).
 54. Zinn K., DiMaio D., Maniatis T. *Cell*, **34**, 865 (1983).

55. Ostrowski M. C., Richard-Foy H., Wolford R. G., Berard D. S., Hager G. L. *Mol. Cell Biol.*, **3**, 2045 (1983).
56. DiMaio D., Corbin V., Sibley E., Maniatis T. *Cell. Mol. Biol.*, **4**, 340 (1984).
57. Stenlund A., Lamy D., Moreno-Lopez J., Ahola H., Pettersson V., Tiollais P. *EMBO J.*, **2**, 669 (1982).
58. Pourcel C., Louise A., Gervais M., Chenciner N., Dubois M. F., Tiollais P. *J. Virol.*, **42**, 100 (1982).

УКАЗАТЕЛЬ ЛАТИНСКИХ НАЗВАНИЙ

Acetobacter xylinum 214
Agrobacterium tumefaciens 214, 316—377
 — — конъюгация 332, 333
 — — совместное культивирование с растительными клетками 345, 350—353
 — — A316 331
 — — GV3102 331
 — — LA4404 331
Alcaligenes faecalis 214
Aspergillus oryzae 107
Azotobacter vinelandii 214

Bacillus 230—249
 — *amyloliquefaciens* 233
 — *cereus* 233, 243
 — *circulans* 243
 — *coagulans* 231
 — *freudenreichii* 231, 243
 — *licheniformis* 234, 243
 — *pumilus* 233, 234, 249
 — *sphaericus* 231, 243
 — *stearothermophilus* 233
 — *subtilis* 231—236, 238, 240—243, 246, 248
 — — получение протопластов 243—245
 — — приготовление и хранение компетентных клеток 240—243
 — — штаммы 231—232
Caulobacter crescentus 214

Drosophila melanogaster 29, 36

Erwinia carotovora 214
Escherichia coli 15, 26, 36, 42—46, 49—

55, 58, 73, 75, 78—80, 101—104, 122, 140—173, 175—189, 193, 197—204, 213—223, 230, 231, 235, 237, 238, 241, 245, 248, 254, 255, 259, 266, 272, 288, 330—332
 — — для клонирования генов 29, 288, 289
 — — используемые в качестве хозяев 52
 — — коллекции 142, 167. См. также Американская коллекция типовых культур
 — — конъюгация 332
 — — расщеп клеток 167
 — — тепловой шок 167—168
 — — трансформация 140—173
 — — хранение 142—144, 151—152, 168
 — — штаммы 140—144, 181, 193—194, 197—199
 — — BA1 289
 — — BMH71-18 197, 199
 — — BNN103 79, 80
 — — BNN93 79, 80
 — — BNN97 80
 — — C600 140, 141, 280, 289
 — — *dam* 193, 194
 — — DB6656 289
 — — DH1 141, 142
 — — DH5 142
 — — GM99 197
 — — HB101 141
 — — hisB463 289
 — — JM105 181
 — — JM109 141, 142
 — — MC1061 141, 142
 — — MM294 142
 — — trpC9830 289
 — — SK1592 216
 — — Y1088 80
 — — Y1089 80
 — — Y1090 80
 — — χ_{1776} 141

Gluconobacter sp. 214

Homo sapiens 29

Klebsiella aerogenes 214

Methylophilus methylotrophus 214

Nicotiana 316
 — *tabacum* 324

Pseudomonas 206, 213, 216—218, 220
 — *aeruginosa* 208, 214, 216, 223, 224, 228
 — *putida* 206, 214, 216, 224
 — sp. 217
 — *stutzeri* 215

Rhizobium 206
 — *leguminosarum* 214
 — *meliloti* 214
Rhodopseudomonas sphaeroides 214

Saccharomyces cerevisiae 29, 285, 291
Serratia marcescens 214
Staphylococcus aureus 74, 100, 233
Streptomyces 251—284
 — *ambofaciens* 254, 258
 — *antibioticus* 257
 — *asoreus* 257
 — *aureofaciens* 258
 — *clavuligerus* 251, 264
 — *coelicolor* 251, 252, 259, 260
 — *apinosus* 258
 — *fradiae* 258
 — *granuloruber* 258
 — *lividans* 257, 259, 281
 — *parvulus* 252
 — *rimosus* 255, 257, 281
Strongylocentrotus purpuratus 29

Thiobacillus 206, 220
 — *ferrooxidans* 206
 — sp. 215
Triticum aestivum 29

Xanthomonas compestris 214

Yersinia enterocolitica 214

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Агар в составе сред 56
— для посева *E. coli* 167
— для регенерации протопластов 279—280
— для хранения *E. coli* 143
Агароза 334
Аденин 193—194
S-Аденозилметионин 76, 79
Аденозин-5'-фосфат 79
Актинородин 252
Актинофаг ϕ 31 261
Актинофаги 272
Алкогольдегидрогеназа 293, 385, 386
Аллель, его «спасение» 303—306
Аллельные последовательности см.
Обмен аллельными последовательностями
 α -Аманатин 318
Американская коллекция типовых культур 45, 80, 232
Амилаза 237
Амплификация 31—32, 94—96, 172—173
Антибиотики 207—209, 251. См. также Устойчивость к антибиотикам
— для культивирования растительных клеток 332, 343
Антигены 127—129
Антитела, абсорбция пластинами из поливинилхлорида 124—125
— иммобилизация 124—125
— и перекрестно реагирующий материал (ПРМ) 287
— поликлональные 102—103
— применение в дот-анализе 477—479
— скрининг библиотек 73—75, 100—103, 286—287
— IgG 124
Ауксины 318, 319
Ауксотрофность 289—290
- Бактериофаг Φ 137, 139
— 13—17, 42—49, 55, 107
— — амплификация 31—32
— — бляшки 33—35, 80, 81, 93, 94
— — размер 47—49
— — ген *gam* 45—47, 49, 54
— — *red* 46, 47, 49, 54, 115, 116
— — гибридизация 33—36
— — замораживание 94
— — конструирование библиотек 51—55
— — лизогенный цикл 42
— — литический цикл 42, 44
— — отделение центрального фрагмента 17
— — промоторы 42, 43, 136
— — рекомбинация 36—38, 46
— — репликация ДНК 44—46
— — селекция против родительских фагов 49—50, 52
— — упаковка *in vitro* 15, 16, 21, 25—27, 115
— — Харон 7 107
— — Харон 16 107
— — NM1149 72, 107, 116
— — NM1150 72, 116
— — NM514 108
— — NM553 116
— — NM607 107
— — NM641 72, 116
— M13 177—179, 192, 197, 199
— Spi 52
— ϕ 105 237
Бактериофаги бацилл 237
— нитевидные 191—205
Бациллы, методы клонирования в них 230—249
— получение протопластов 243—245
— приготовление протопластов 243—245
— приготовление и хранение компе-

- тентных клеток 240—242
— трансформация 243
— устойчивость к эритромицину 248—249
— штаммы 231—238
— экспрессия генов 245—249
А-Белок 74, 100
Библиотеки геномной ДНК 13—69, 262—264
— λ -векторов 28, 31—32
— кДНК 71—106, 173
— необходимый размер 28, 171
— плазмид 171—173
— скрининг зондами 98—103
— — путем гибридизации 32—36, 55, 67—69
— хранение 171—173
Био-Гель 79, 89—92
Биологическая безопасность 227—228
Блот-гибридизация 363
Бляшки вируса осповакцины 471, 479—480
— фага λ 33—35, 47—49
— — прозрачные 80, 81, 93, 94
5-Бром-4-хлоро-3-индолил- β -D-галактозид (X-Gal) 79, 120, 124, 126, 133, 176, 188
BBL-Бульон 56
L-Бульон 56, 137, 162, 187
X-Бульон 162
Бутират 422—423
Буфер (буферы) для замораживания клеток 157—158
— для конструирования библиотек 56
— для метилазы 113
— для полимеразы 113, 114
— для трансформации 157—160, 166
— лигазный 56
— фаговый 56, 187
— FB 158
— FS B 157
RF 159
SB 158
— SSC 56
— TE 56
— XFB 158
- Векторы автономные 292, 294, 295
— альтернативного переноса *onc+*/*onc-* 326—328
— бинарные для введения в ДНК растения 335—338
— группы несовместимости 214
— для грамотрицательных бактерий 206—209
— для клонирования в дрожжах 294—295
— для поиска промоторов 224—227
— замещения 13—17, 50—51
— и экспрессия чужеродных генов см. Экспрессия чужеродных генов
— интегрирующиеся 294
— малоконические с широким спектром хозяев 224
— на основе фага λ 13—17
— — — Р-элементов 387—388
— — — pSa 214
— — — RSF1010 224—228
— плазмидные 118—131, 134—139, 207—214
— — высококопийные 256—258
— — инсерционные 468—469
— — низкокопийные 259—261
— — одноцепочечные 132—136, 175
— — с широким спектром хозяев 206—228
— семейство pEMBL 132—139
— фагово-плазмидные 237
— фаговые 80—83, 237, 261—262
— Харон 7 107
— Харон 16 107
— Харон 34, Харон 35 39, 45, 47, 51, 54
— челночные дрожжевые 134, 295
— — реплицирующиеся в *E. coli* и *A. tumefaciens* 321, 322, 333—335
— — — в *E. coli* и *B. subtilis* 234
— — — в *E. coli* и стрептомицетах 254, 255
EMBL 134—136
— EMBL3 22, 38, 49, 50, 84
— EMBL4 50, 51
— Опс 322—328
— *opc+* 326
— *opc-* 322—326
— pSV2 410—411
— YIp5 294
— YCp19 295
— YEp 13 294
— YRp17 294
— YEp51 295
— YRp7 294
— YLp21 295
— YLp1 294
— λ gt10 72—73, 75—78, 80—85, 94—96, 115
— λ gt11 73—78, 80—85, 94—96, 100—105
Вирус бычьей папилломы (BPV) как вектор 490—520
— — селекция трансформантов 498—500
— — — структура генома 491—493
— — — транскрипция 494—495
— — — трансфекция 498

- — — трансформирующие свойст-
ва 494, 498
- — — BPV-1 491—507
- — — BPV-*gpt* 503—504
- — — BPV-*neo* 504—507
- — — BPV-*tk* 501—504
- герпеса 464
- ньюкаслской болезни 516
- осповакцины 464—489
- — штаммы 470
- рака молочной железы мышей
(MMTV) 412, 413, 512, 516
- саркомы мышей Молони (MSV)
412—413
- — Рауса (RSV) 411
- SV40 411, 412, 464
- Вода, органические примеси 148, 163
- очистка 164
- Вставки (в ДНК) 16, 192
- β-Галактозидазы 73—75, 132, 176
- выявление 120, 121, 126, 133, 176,
188, 426—428
- химерные 74, 105, 118—130
- Гексаминокобальта хлорид 140
- Ген (гены) аминокликозид-3' — фос-
фотрансферазы 501
- белка теплового шока (*hsp70*) 381,
387
- биосинтеза ауксина (*tms1*, *tms2*)
318
- — цитокинина (*tmr*) 318
- UDP-галактоза-4-эпимеразы 293
- гексокиназы у дрожжей 287
- гиперэкспрессия у дрожжей 295
- гистонов 287
- гликолитических ферментов 287
- β-глобина человека 508, 509, 513
- гормона роста 413, 508, 510
- дигидрофолатредуктазы (*dhfr*)
323, 376
- ДОФА-карбоксилазы 381
- желточного белка 381
- замещение у дрожжей 291, 309—
313
- β-интерферона человека 508, 511,
513, 516
- кислой фосфатазы 293
- клонированные, идентификация
285—291
- — экспрессия 245—249, 513—516
- ксантин-гуанин — фосфоробо-
зилтрансферазы (*gpt*) 433—434,
501
- ксантиндегидрогеназы (*rosy*, *ry*)
381, 385—386
- личиночного сывороточного белка
381
- металлотионеина мыши 508
- — человека 413
- «нарушение» у дрожжей 306—309
- поверхностного антигена HBV 508,
515
- поздние вируса осповакцины 468,
469
- препроинсулина крысы 508, 509
- рибулозодифосфат-карбоксилазы
(*ss Rubisco*) 324, 371
- РНК-полимеразы у дрожжей 287
- тимидинкиназы (*tk*) 501. См. так-
же ТК-рекомбинантные вирусы
- тирозиназы (*mel*) 257—259
- тяжелой цепи HLA человека 508,
514
- устойчивости к ампициллину 305
- — к неомицину (*neo_R*) 381
- — к тиострептому (*tsr*) 259
- — к хлорамфениколу (*cat*) 323,
324
- — к эритромицину (*emrC*) 248—
249
- хлорамфеникол-ацетилтрансферазы
323—325, 381
- эукариотические 507—516
- *actin* у дрозофилы 381
- *cat* 323—325
- *dhfr* 323, 376
- *dph* 501
- *gpt* 433—434, 501
- *emrC* 248—249
- *HIS3* 288, 312
- *HLA* 508, 514
- *LEU2* 288
- *hsp70* 381, 387
- *lacZ E. coli* 118—123, 381
- *mel* 257—259
- *neo_R* 381
- *nos* 322, 323
- *osc* 318, 323
- *recA* 46, 47, 54, 55
- *recB* 45, 46, 54, 55
- *recBC* 45—47, 52, 54, 55
- *recC* 45, 46, 54
- *recE* 46, 52, 54
- *recE4* 232
- *recF* 52, 54
- *red* 46, 47, 49
- *rosy (ry)* 381, 385—386
- *sbcA* 46, 54
- *sbcB* 46, 52, 54
- *ss Rubisco* 324, 371
- *tk* 469
- *tmr* 318
- *tms* 318
- *tsr* 259
- *SUP* 311
- *TRP1* 288

- *URA3* 288, 311, 312
- *white* 381
- Генетицин 387, 435, 507
- Генетические (селективные) маркеры,
восстановление 191
- — выход при сегрегации цепей 192
- — для селекции мутаций без фе-
нотипического проявления у *E. co-
li* 175—189
- — для трансформации у дрозофи-
лы 384—385
- — дрожжевые в плазмидах 134,
305
- Генетический маркер универсальный
182—183
- Гентамицин 207
- Гибридизация как метод клонирова-
ния генов 286—287
- колоний дрожжей 299, 300
- перекрестная 287
- Гибридный дисгенез 381—382
- Гипоксантин-фосфоробозилтранс-
фераза 433—434
- Глицериновый шок 425, 474
- β-Глобин 509
- Градиентное центрифугирование 62—
63, 65, 81
- Грамотрицательные бактерии с широ-
ким спектром хозяев 206—229
- ДЕАЕ-декстрановый метод 423—425
- Дезоксинуклеозидтрифосфаты 204
- 2,2'-Дезоксинуклеотид-5'-фосфаты 78
- Дезоксцитидин 79
- Делении 53
- в палиндромных последовательно-
стях 53
- Рес-зависимые 19
- направляемые олигонуклеотидами
192
- Дехоронизация эмбрионов дрозо-
филы 392—394
- Дигидрофолатредуктаза 323, 376, 378
- Диметилсульфоксид (ДМСО) 142,
148, 159, 161, 163, 164, 166
- Диметилсульфоксидный шок 474
- Дифенилаланиновый тест 362—364
- 2,4-дихлорфеноксиуксусная кислота
207, 208
- Длинный концевой повтор 412—413
- ДМСО см. Диметилсульфоксид
- ДНК актинофагов 272
- векторная 17, 22—24, 63—65, 80—
83, 214—215
- вируса осповакцины 477—478,
481—483
- выделение из дрожжей 300—302
- — из животных клеток 500
- — из мицелия стрептомицетов 270
- — из отдельных колоний *A. tume-
faciens* 335
- — из растений 358—367
- — из стрептомицетов 267—272
- высокомолекулярная 16, 17, 59—
61, 220
- геномная 13—69
- гетеродуплексная 192—205
- двухцепочечная 83—96, 180
- донорная 17—22, 29—31
- дрожжевая, «непредставленная»
в *E. coli* 290
- инъекция в эмбрионы дрозофилы
397—400
- кольцевая ковалентно замкнутая
271, 272
- — 2 мкм у дрожжей 292
- матрица 137
- низкомолекулярная 500
- одноцепочечная (одДНК), выде-
ление из плазмиды pEMBL 134—
139
- — из фагов 179, 197
- — неметилированная 197—198
- определение ее концентрации в
препаратах нуклеиновых кислот
362
- — последовательности оснований
в ней 201, 203, 204
- — осаждение спиртом 57
- — плазмидная, выделение из бацилл
238—240
- — — из клеток млекопитающих
414—415
- — — из стрептомицетов 262—264,
271—272
- — «спасение» у дрожжей 300—
302
- радиоактивное мечение 13, 481—
482
- растительных клеток, блот-гибри-
дизация 335, 362, 363
- — — выделение 361—363
- рекомбинантная 29, 36—38
- репарация неспаренных оснований
в *E. coli* 193—194
- способ «перепрыгнуть» через по-
вторяющийся элемент 40
- упаковка in vitro 25—27, 66—67,
72, 73, 93, 138, 139, 221
- фракционирование 62—63, 65
- хлоропластов и митохондрий 366
- частично дуплексная (чдДНК)
194—195, 200—201
- ядерная, выделение из листьев и
каллуса 365—367
- ДНКза 255—256

ДНК-лигаза T4 78, 88, 89, 114, 202
 ДНК-полимераза I 76—78, 181, 202, 204
 — достройка концов 39, 87—88
 Дот-гибридизация 477—478
 Дрожжи 285—313
 — штаммы для клонирования 289
 Дрозофила, Р-зависимая трансформация клеток зародышевого пути 381—408
 — линии для трансформации 388
 — — М 382, 384, 389
 — — Р 382
 — трансформанты 400—405
 — эмбрионы, дехорионизация 392—393
 — — сбор 391—392
 ДТТ 159, 160
 Дубликации 19

Замены оснований 178—179
 Замораживание 141, 143, 151—155, 168, 172, 237, 242
 Замороженные аликваты 172
 — клетки 143, 152—155
 Зародышевый путь дрозофилы 381—408
 Затравка синтетическая 195—196
 Зонды 98—103

Игла для микроинъекций ДНК 305—306
 Изопропанол 25
 Изопропил-β-D-тиогалактопиранозид (IPTG) 74, 78, 79, 104, 120, 188
 Иммунодетекция 477—479
 Иммунопреципитация 484—485
 Иммуноскрининг 480
 Иммуносорбция 127, 484—485
 Иммунофлуоресценция 485—488
 Иницирующий кодон 134, 136
 Инозинмонофосфат (IMP) 433
 Инсерционная инактивация 258, 260
 Интеграция — вырезание 184—185
 — плазмид 291, 294, 302—303

Кальций-фосфатный метод 420—423
 — преципитат 422, 472, 474
 Канамицин 207, 208
 Каталог бациллярных штаммов плазмид и фагов 232
 Катехол-2,3-оксигеназа (K230) 223—224

Катионы моновалентные 140
 кДНК, клонирование 71—98, 107—117, 168—173
 — — λ-векторами 71—98
 — — метод Окаямы и Берга 107
 — — размеры клонов 97—98, 107
 — конструирование библиотек 71, 107
 — «ложные» рекомбинанты 92
 — присоединение *EcoRI*-концов 89
 — синтез 76—78, 83—89, 108—117
 — — второй цепи 85, 110—113
 — — первой цепи 83—85, 109—110
 — структурные аномалии 98
 Киназа 88
 Клетки млекопитающих, культивирование 416—425
 — — перенос генов 409—437
 — — субкультивирование 418—420
 Клонирование в бациллах 230—249
 — в дрожжах 285—313
 — в стрептомицетах 251—284
 — кДНК 71—98, 107—117, 168—173
 — 3'-концевой области гена *lacL* 122—123
 — 5'-концевой области гена *lacL* 119—121
 — фрагментов ДНК 215, 220—222
 Комплементация 288—291, 299
 Конъюгативный перенос плазмид 328—333
 Конъюгация бактерий 332
 Корончатые галлы 317, 345
 Космиды 13, 55, 219—221
 — с широким спектром хозяев 220
 Ксантиндегидрогеназа 385—386
 Культивирование клеток, метод отдельных бляшек 470—471
 — — млекопитающих 416—424
 — — монослоя 470
 — — почки обезьяны 469
 — — суспензии 470

«Летальный зигозис» 256, 258—260, 280
 Лигаза 78, 202
 Лигирование 19, 26, 58, 226
 — ДНК двухпочечной с вектором 113
 — — плазмид 274—275
 — кДНК с векторной ДНК 93, 113—116
 — определение оптимальных условий 65—67
 Лизат 104—105
 Лизис бактериальных колоний 125—126
 Лизогенизация 103—105

Лизогены 104—105
 Лимфоциты 424
 Линкеры, удаление их избытка 89—92, 114
 — *EcoRI* 79, 89—92
 Лиофилизация 237
 Липкие концы 14—16, 22—24, 27, 38
 — — достройка 39, 87—88, 114

Метилаза 86, 113, 114, 193
 — *dam* 193—194, 198
 — *EcoRI* 76—78, 86, 87, 114
 Метилирование аденина в положении N6 193—194
 — рибосом 281
 — РФ-ДНК 199—200
 — *EcoRI*-сайтов 113
 Микроинъекции 390, 397—400
 Мини-клетки 246—248
 Мини-хромосомы 292
 Множественные вставки 16
 Мобилизация плазмид 217—219, 227—228
 мРНК, выделение из препарата РНК 368
 — клонирование ее генов 286, 287
 Музей бациллярных культур 232
 Мутагенез 175—176, 180—182
 — в нитевидных фагах 191—205
 — индуцированный бисульфитом 183
 — направленный 183, 191—193
 — *in vitro* 175—176, 180—181
 Мутанты 176—182
 Мутации, не имеющие фенотипического проявления у *E. coli* 175—189
 — перенос 185
 — сдвига рамки считывания 185, 188
 — споруляции бацилл 231
 «Мутационное клонирование» 261
 Мутация *hflA* 73
 — *rooty* 318, 326

Ник-трансляция 99
 Нопалин 317, 318
 Нопалинсинтаза 372
 Нуклеаза SI 76—78, 85—87, 98

Обмен аллельными последовательностями 183—189
 — — — путем интеграции — вырезания 184
 Обратная транскриптаза 76—78, 84, 85, 110
 — — единица 83
 — — использование в мутагенезе 175—183

Октопин 317, 318
 Октопинсинтаза 372—375
 Олигонуклеотиды, использование в мутагенезе *in vitro* 175, 191—205
 — комплементарные липким концам 38
 — химический синтез 195—196
trp-Оперон 223
 Опины 318, 321

α-Пептид β-галактозидазы 132, 176
 Перенос генов 409—437
 — — ДЕАЕ-декстрановый метод 409, 423—425
 — — кальций-фосфатный метод 409, 420—423
 — — хромосом 435—437
 Пероксидаза 431
 Плазмидные библиотеки 168—173
 Плазмиды 134—139, 207—214
 — гибридные (химерные) 234—235, 501—507
 — для клонирования в бациллах 231—237
 — интеграция с геномом 170—171, 187, 302—303
 — исключение (утеря) 188, 290—291
 — линейные 292
 — мини-Sa 213, 214
 — на основе BPV-1 495—507
 — нестабильность 235—236
 — нетрансмиссивные 208, 218, 227
 — нопаиновые 317—318
 — октопиновые 317—318
 — получение из *Pseudomonas* 215, 216
 — рекомбинантные 495, 496
 — семейство pEMBL 132—139
 — — как дрожжевой маркер 134
 — — pUC 132
 — стрептомицетов 256
 — «токсичная» последовательность в pBR322 496
 — устойчивость к антибиотикам 207—213
 — физические карты 136, 235—236
 — челночные 233, 234, 254, 255
 — inc Q/w 208—213
 — IncW 213—214
 — pA90 503
 — pAAH5 295
 — pAB112 295
 — pAB124 233
 — pAG60 506
 — pAL4404 331, 337
 — pAT153 494

- pB2 496, 498
- pBC16 233
- pBD6 234
- pBD64 234
- pBD8 234
- pBD9 234
- pBPV-1 495
- pBPV-1 8-2 496, 498
- pBPV-1 9-2 496, 498
- pBPV-1-DI 496, 498
- pBPV69T 496, 498, 503
- pBR322 218, 234, 322—323, 325, 326, 495
- pBR325 325
- pBR327 495
- pBS1 233
- pC194 233—235
- pC221 233
- pC223 233
- pCGBP 504—506
- pCPP-3 234
- pdBPV69T 496, 498
- pdMMTneo (302-3) 506
- pdBPV-MMTneo (342-12) 505—507
- pE194 233—235, 248
- pEMBL18, pEMBL19 133
- pEMBL 132—139
- pEMBL8 133, 136
- pEMBL9 133—135
- pFG105 258
- pFJ103 258
- pFTB14 233
- pGJ28 328, 330, 331
- pGS20 468
- pGV1106 211
- pGV1122 211
- pGV2215 331
- pGV3105 331
- pGV3850 322, 323, 325, 326, 330, 331, 333, 334
- pGV3851 326, 331
- pHV11 — pHV41 234
- pIJ101 257
- pIJ161 259
- pIJ350 257
- pIJ61 259
- pIJ702 257—259
- pIJ922 260—261
- pIM13 233
- pIS28 233
- pJD219 294
- pJK3 234
- pJP4 207
- pKT210 210, 212
- pKT212 210
- pKT214 210
- pKT230 210, 212, 218, 227
- pKT231 210, 212, 227
- pKT240 210—212, 225
- pKT262 210, 227
- pKT263 210, 227
- pLA4404 336, 337
- pLAFR1 211
- pLG221 218
- pLG223 218
- pLGVneo1103 324, 325, 331
- pLS103 234
- pLS105 234
- pLS28 234
- pLTP1 468
- pM69 496
- pMB2 496, 498
- pME290 211, 224
- pMH4 496
- pML2 495
- pMLBPVTk2 503
- pMLBPVTk4 502, 503
- pMM4 468
- pMMB22 211, 222, 224
- pMMB24 211, 222, 224
- pMMB25 223, 224
- pMMB33 210, 220—222
- pMMB34 210, 220—222
- pMON 120, 327
- pMP61 331
- pMPG1 326
- pOG2165 234
- pPL10 233
- pPL608 234
- pPL7065 233
- pPL708 234
- pPZ33 255
- pл25,7с 383, 389, 396
- pRK2013 331, 338
- pRK2501 211
- pRK290 211
- pRP301 211
- pRSV-β-глобин 412
- pRSVcat 412
- pRSVgsp 412
- pRSVneo 412, 413
- pS194 233
- pSA2100 233
- pSa322 218
- pSa501 233
- pSC194 233
- pSV2 410—411
- pT110 234
- pT112 234
- pT127 233
- pTB90 234
- pTiAch5 337
- pTiB6S2 326, 331
- pTiB6S3 327
- pTiC58 326
- pTich5 331
- pUB110 233, 234

- pUB112 233, 236
- pUC101 258
- pUC1061 258
- pUC6 258
- pUK230 120
- pU250 120
- pUK270 119—123
- pUK290 122, 123
- pV69 506
- pWWO161 207, 223
- pYE4 295
- R18 207
- R64 218, 328, 330
- R68 207, 208
- R1162 207
- R300B 207
- RK2 207, 208, 218
- RMS149 207
- RP1 207, 208
- RP4 207, 208, 227
- RSF1010 207—210, 212—214, 216, 218, 224—228
- SCP2 260, 261
- SLP1.2 259—261
- Ti 316—323, 327, 328, 331—336
- — выделение из *A. tumefaciens* 335
- — генетическая карта 318
- — конъюгативный перенос 333
- — полиаденилированные транс-крипты 317
- — *vir*-область 319, 335—336
- Плазмиды-помощники 218, 227
- Полиаденилирование 411
- Поливинилхлоридные пластины (ПВХ) 124—126
- Полилинкер pUC8 185—187
- pUK270 121
- Полилинкеры 51
- Полинуклеотидкиназа T4 78, 88, 114, 115
- Полиуридиловая кислота 99
- Полиэтиленгликоль (PEG4000) 293, 355
- Половой фактор *Streptomyces coelicolor* 260
- Последовательности автономно реплицирующиеся (*ars*) см. *ars*-Последовательности
- плазмидной ДНК, замещение 307
- теломерные и центромерные 292
- *Alu* 41
- *ars* 134, 292, 305—306
- *Chi* 47
- Препаративная реакция 28
- «Прогулка по хромосоме» (по геному) 13, 31, 38—42, 55, 290
- Промотор (промоторы) вируса осповакцины 468—469
- — саркомы Рауса 412, 413
- UDP-галактоза-4-эпимеразы 293
- гена гормона роста 413
- металлотионеина мыши 508
- — человека 413
- индуцибельные у млекопитающих 413
- кислой фосфатазы 293
- на основе RSF1010 224—227
- нопалин-синтазы 320, 322, 326
- плазмидные, рекомбинация с хромосомными гомологами 236
- ранних генов вируса SV40 411, 412
- транслокация в ген *tk* вируса осповакцины 469
- фаговые у бацилл 236, 237
- *meta* 223
- *tac* 223
- Протоонкогены 287
- Протопласты бацилл 243—245
- растительных клеток 345—352
- — — совместное культивирование с *Agrobacterium* 350, 351
- стрептомицетов 275—279
- Протеазы *B. subtilis* 231
- *E. coli* дефектные 73, 75, 94, 100, 103
- Профаги PBSX, SPβ 231
- Радиоавтография 478, 485
- Радиоактивное мечение ДНК 13, 481—482
- — РНК 13
- — EcoRI-линкеры 88, 114
- Рассев клеток *E. coli* 80, 167
- фагов 80, 94—96
- Растворы для выделения плазмидной ДНК 239
- для культивирования клеток млекопитающих 416, 418, 421, 424
- Растения, генетическая инженерия 315—379
- устойчивость к антибиотикам 320
- Реагенты для трансформации протопластов 244
- — — *E. coli* 161—163
- Регенерация протопластов 278—280
- трансформированных растений 354—358
- Рекомбинантные конструкции 464—489
- — на основе вируса осповакцины 464—489
- — ТК 482
- Рекомбинация двойная 185
- гомологичная 291, 302, 207

- между ДНК вируса осповакцины и плазмидами 465
- при обмене аллельных последовательностей 184, 185
- путь *RecE* 46, 52, 54
- — *RecF* 52, 54
- у дрожжей 291, 303, 307, 308
- у дрожжей 291, 303, 307, 308
- у стрептомицетов 256
- у *B. subtilis* 232, 236
- Репарация 290, 305, 306
- Репликация автономная 292, 294
- Репликоны 183—189
- lac*-Репрессор 224
- Рестриктаза *BamHI* 19, 22—25, 58—59, 63, 64, 72, 74, 209—213, 259, 260
- *BglII* 72, 74, 259
- *EcoRI* 22—25, 58, 59, 72, 74, 76, 88—92, 209—213, 383
- *HindIII* 20, 58, 72, 74, 209—213, 383
- *KpnI* 74
- *MboI* 19, 23, 58, 260
- *PstI* 259, 260
- *PvuI* 74
- *Sall* 22—25, 58, 72, 383
- *Sau3A* 19—21, 23, 58, 61—62, 72, 260
- *XbaI* 260
- *XhoI* 72, 74, 79, 383
- Рестриктазы 14—16, 19—25, 77, 78
- Рестрикция 19—25, 53, 55, 72, 74, 216
- у стрептомицет 253—255
- Рестрикты 14, 15
- *B. subtilis* 232
- Рибонуклеопротеины 367, 368
- Рибулозодифосфат—карбоксилаза 324, 371
- РНК, выделение из растений 358, 367—371
- клонирование ее генов в дрожжах 286
- радиоактивное мечение 13
- рибосомная 368—369
- РНК-полимераза II 318
- poly(A)*+РНК 369, 371
- РНКаза H 107, 111
- РНКазин 109
- РФ-ДНК 199—200
- Селекция 36
- гибридизационная у дрожжей 286—287
- замен оснований 178—179
- клеток млекопитающих 433—435
- мутаций, не имеющих фенотипического проявления 175—189
- на устойчивость к неомицину 435
- против родительских фагов 49—50
- тимидинкиназная 433
- poly(U)*-Сефароза 368, 369
- Силиконирование колонок 89
- пробирок 108
- Скрининг антителами 74, 100—103
- библиотек 71, 73—75, 94, 98—103
- бляшек 75
- при помощи гибридизации 32—36, 67—69, 99
- — — рекомбинации 36—38
- Споры стрептомицетов 264—265
- Среда для *gpt*-селекции 434
- Игла 417
- Спицайзена 238
- LB 162
- LM 162
- NZY 162
- Psi 163
- SOB 162
- SOC 162
- VY 237
- Среды для конструирования библиотек 56
- для культивирования бацилл 237—238
- — — дрожжей 297—299
- — — клеток млекопитающих 416—418
- — — растений 341—342
- — — стрептомицетов 281—284
- с повышенным содержанием магния 140
- Стрептомицеты 251—284
- геномный банк 262—264
- мини-клетки 246—248
- устойчивость к виомицину, неомицину, эритромицину 281
- штаммы для клонирования 252, 264—265
- Тепловой шок 140, 167—168, 387
- САТ-Тест 325, 426—428
- Тимидинкиназа (ТК) 433, 465, 474—476, 482
- Тирозиназа 257, 258
- Точковые мутации 192
- Р-Транспозон 407
- Трансфекция 16, 25, 27, 140, 202, 472—473
- в клеток млекопитающих 423—425, 429—431
- Трансформанты, идентификация — селекция 280—282, 498, 499

- Трансформация граммотрицательных бактерий 215—217
- дрожжей 291, 293—297
- клеток вирусом бычьей папилломы 494, 508—512
- — временная 409, 425—431
- — зародышевого пути дрозофилы 381—407
- — стабильная 409, 431—433
- колоний *E. coli* 141, 149—152
- лигированной кДНК 169—170
- плазмид χ 1776 155, 160—161
- плазмидной ДНК 232
- потребность в хелперном элементе 388—389
- протопластов 277—278, 353—355
- растительных клеток 342—345
- сферопластов 293, 296
- эффективность 406, 253, 406, 503.
- См. также Трансформация *E. coli*
- *A. tumefaciens* 339
- *B. subtilis* 240, 243
- *E. coli* 140—173
- — — быстрая 141, 150—152
- — — влияние загрязнений 147—149
- — — выбор штамма 140, 142
- — — высокоэффективная 145, 147—149, 168
- — — оценка результатов 164—166
- — — простая 141, 144—145
- — — стандартная 141, 145—149
- Триродительское скрещивание 330—332
- гРНК 369
- Упаковка ДНК двухпечочной 77, 93
- однопечочной 138, 139, 221
- λ 25—27, 66—67, 72, 73
- Устойчивость к антибиотикам 207—209, 320
- к ампициллину 207, 210, 211
- к виомицину 261, 281
- к G418 504—507
- к ионам ртути 207
- к канаваину 310
- к канамицину 207, 210, 211, 213, 504
- к метатрексату 376
- к метилнеомицину 260
- к неомицину 260, 281, 386—387, 435, 504—507
- к пенициллину 208
- к радиации 290
- к спектиномицину 207, 210, 211
- к стрептомицину 207—213
- к сульфонидами 208, 209
- к тетрациклину 188, 207, 208, 210, 211
- к тиострептому 257, 259, 261, 281
- к триметоприму 376
- к 5-фторовой кислоте 312
- к хлорамфениколу 207, 212
- к циклогексимида 310
- к эритромицину 248—249, 281
- Фенотип Dam 198
- Феромон дрожжей 293
- Фибробласты куриного эмбриона 482
- Фосфатаза 272—274
- Фосфотрансфераза 281
- Хелперы Р-элементов 388—389, 406
- Хлорамфеникол 207, 212, 414
- Хлорамфеникол-ацетилтрансфераза (CAT) 323—325, 375, 426—427
- Хлороформ 125—126
- Хлорохин 423, 425
- Хранение бацилл 237, 240—245
- *E. coli* 151, 152, 168
- Хромосомные балансеры 386
- Цезия хлорид (хлористый цезий) (CsCl) 18, 60—63, 65, 81, 361
- oligo(dT)-Целлюлоза 78, 79, 109, 368—370
- Центрифугирование в градиенте плотности 19, 62—63
- Центромерные последовательности 292
- Цетилтриэтиламмонийбромид (СТАВ) 359, 361
- Цитокинины 318, 319
- М-Цитотип 384
- Р-Цитотип 382
- ЭДТА 188
- Экспрессия генов в клетках млекопитающих 425—433

- — чужеродных 245—249, 464—
489, 513—516
- Электрофорез в агарозном геле 19—
21, 61
- в щелочном геле 86, 87, 112
- в денатурирующем полиакрил-
амидном геле 204
- получение фрагмента ДНК 180
- Р-Элементы 381—384, 407
- Эндонуклеаза V 45—47
- Энхансер BPV 502, 505
- SV40 411
- Эписома F'lac 119
- Этидиумбромид 20

ОГЛАВЛЕНИЕ

От редактора перевода	5
Из предисловий к I и II томам	7
Список авторов	9
Список сокращений	11

КНИГА I

Глава 1. Использование векторов замещения на основе фага лямбда для конструирования представительных библиотек геномной ДНК (Ким Кайзер и Норин Мюррей)	13
1. Полная библиотека	13
2. Принципы клонирования в λ -векторах замещения	14
3. Донорные и векторные ДНК	17
4. Рекомбинация и упаковка	25
5. Препаративная реакция	28
6. Необходимый размер библиотеки	28
7. Работа с ограниченным количеством донорной ДНК	29
8. Амплификация	31
9. Скрининг при помощи гибридизации	32
10. Другие методы скрининга и селекции	36
11. Анализ рекомбинантных молекул ДНК	36
12. «Прогулка по хромосоме»	38
13. Бактериофаг λ	42
14. Селекция против родительских фагов	49
15. Выбор вектора замещения	50
16. Выбор бактерии-хозяина	51
17. Фаг λ или космида?	55
18. Методические подробности	56
Литература	69
Глава 2. Конструирование и скрининг библиотек кДНК в векторах λ gt10 и λ gt11 (Тхань В. Кхунь, Ричард А. Янг, Рональд В. Дэвис)	71
1. Введение — λ -векторы для клонирования кДНК	71
2. Синтез и клонирование двухцепочечной кДНК в λ gt10 и λ gt11	76
3. Скрининг библиотек в λ gt10 и λ gt11 зондами на основе нуклеино- вых кислот	98
4. Скрининг библиотек в λ gt11 зондами на основе антител	100
5. Получение рекомбинантного антигена из бактерий, лизогенизиро- ванных рекомбинантным фагом λ gt11	103
Литература	106

Глава 3. Еще одна методика синтеза двухцепочечной кДНК для клонирования в фаговых и плазмидных векторах (<i>Кристин Дж. Уотсон и Джеймс Ф. Джексон</i>)	107
1. Введение	107
2. Синтез кДНК	108
3. Упаковка <i>in vitro</i> и расщепление гибридных фагов	115
4. Заключительные замечания	115
Литература	117
Глава 4. Иммунологический метод выявления химерных β-галактозидаз, экспрессируемых плазмидными векторами (<i>Михель Кёнен, Ганс-Вернер Гриссер и Бенно Мюллер-Хилл</i>)	118
1. Введение	118
2. Клонирование в 5'-концевой области гена <i>lac Z</i>	119
3. Клонирование в 3'-концевой области гена <i>lac Z</i>	122
4. Практические методики	124
5. Общие замечания	130
Литература	131
Глава 5. Семейство одноцепочечных векторов pEMBL (<i>Лючиана Денте, Маурицио Соллаццо, Козима Бальдари, Джанни Чезарени и Рикардо Кортесе</i>)	132
1. Введение	132
2. Семейство pEMBL	132
3. Одноцепочечные плазмидные векторы для специальных целей	134
4. Методика получения одноцепочечной ДНК pEMBL	136
Литература	139
Глава 6. Методы трансформации <i>E. coli</i> (<i>Дуглас Ханаан</i>)	140
1. Введение	140
2. Выбор штамма	140
3. Хранение штаммов <i>E. coli</i>	142
4. Методики трансформации	144
5. Реактивы	161
6. Оценка результатов трансформации	164
7. Практические замечания	167
8. Специальные случаи	168
Литература	173
Глава 7. Применение генетических маркеров для селекции и аллельного обмена индуцированных <i>in vitro</i> мутаций, не имеющих фенотипического проявления у <i>E. coli</i> (<i>Джанни Чезарени, Чинца Трабони, Джаннаро Чилиберто, Лючиана Денте и Рикардо Кортесе</i>)	175
1. Общий метод индукции и выявления замен оснований	175
2. Общий метод обмена аллельными последовательностями между двумя репликонами	183
Литература	189
Глава 8. Направляемый олигонуклеотидами мутагенез в рекомбинантных нитевидных фагах (<i>Ханс-Иоахим Фриц</i>)	191
1. Введение и теоретическое обоснование метода	191
2. Экспериментальные методики	195
Литература	205

Глава 9. Векторы для грамотрицательных бактерий с широким спектром хозяев (<i>Ф. Кристофер Х. Франклин</i>)	206
1. Введение	206
2. Плазмиды с широким спектром хозяев	207
3. Практическое применение векторов с широким спектром хозяев	214
4. Векторы с широким спектром хозяев для специальных цепей	219
Литература	228

КНИГА II

Глава 1. Методы клонирования в бациллах (<i>Кимбер Г. Харди</i>)	230
1. Введение	230
2. Штаммы и плазмиды	231
3. Выделение плазмидной ДНК	238
4. Приготовление и хранение компетентных клеток	240
5. Методы изучения экспрессии генов в клетках бацилл	245
Литература	249
Глава 2. Клонирование генов в стрептомицетах (<i>Айан С. Хантер</i>)	251
1. Введение	251
2. Стратегия клонирования ДНК в стрептомицетах	252
3. Культивирование штаммов	264
4. Практическое руководство по клонированию ДНК	265
5. Среда	282
Литература	284
Глава 3. Клонирование в дрожжах (<i>Родни Ротстейн</i>)	285
1. Введение	285
2. Идентификация клонированных генов дрожжей	285
3. Векторы для молекулярного клонирования в дрожжах и методы трансформации	291
4. Манипулирование с клонированными ДНК	402
Литература	313
Глава 4. Генетическая инженерия растений (<i>Конрад Лихтенштейн, Джон Дрейпер</i>)	315
1. Введение	315
2. Плазмидные векторы, позволяющие вводить чужеродные ДНК в клетки растения	317
3. Введение ДНК в растительные клетки и регенерация трансформированных растений	338
4. Выделение из растений ДНК и РНК	358
5. Изучение структурной организации и экспрессии чужеродной ДНК в растительной ткани	371
6. Перспективы на будущее	377
Литература	379
Глава 5. Р-зависимая трансформация клеток зародышевого пути дрозофилы (<i>Роджер Э. Кэресс</i>)	381
1. Введение	381
2. Принцип метода	381
3. Планирование экспериментов по трансформации	384
4. Подготовка препаратов для микроинъекций	390
5. Инъекция ДНК в эмбрионы	397

6. Поиск трансформантов	400
7. Характеристика трансформантов	401
8. Факторы, влияющие на успех эксперимента	406
9. Ремобилизация Р-транспозона у трансформированных мух	407
Литература	407
Глава 6. Высокоэффективный перенос генов в клетки млекопитающих <i>(Корнелия Горман)</i>	409
1. Введение	409
2. Векторы, используемые для экспрессии чужеродных генов в клетках млекопитающих	410
3. Приготовление ДНК	414
4. Культивирование клеток	416
5. Кальций-фосфатный метод	420
6. ДЕАЕ-декстрановый метод	423
7. Временная экспрессия	425
8. Стабильная экспрессия	431
9. Прямой перенос хромосомных генов	435
Литература	437
Глава 7. Создание рекомбинантных конструкций на основе вируса оспы <i>вакцины для экспрессии чужеродных генов (Майкл Мэккетт, Джеффри Смит и Бернард Мосс)</i>	464
1. Введение	464
2. Конструирование рекомбинантных вирусов	466
3. Характеристика рекомбинантов	481
4. Заключение	488
Литература	489
Глава 8. Вирус бычьей папилломы: эукариотический вектор для молекулярного клонирования <i>(М. Саверия Кампо)</i>	490
1. Введение	490
2. Вирус BPV-1	491
3. BPV-1 в качестве вектора	495
Заключение	517
Литература	519
Указатель латинских названий	522
Предметный указатель	524

УВАЖАЕМЫЙ ЧИТАТЕЛИ

Ваши замечания о содержании книги, ее оформлении, качестве перевода и другие просим присылать по адресу:
129820, Москва
1-й Рижский пер., д. 2,
издательство «Мир»

В 1987—1988 г. г. ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»
ПУБЛИКУЕТ В ПЕРЕВОДЕ С АНГЛИЙСКОГО
СЛЕДУЮЩИЕ КНИГИ СЕРИИ «МЕТОДЫ»,
ВЫПУЩЕННЫЕ «ИРЛ ПРЕСС», АНГЛИЯ

НАУЧНОЕ ИЗДАНИЕ

Ким Кайзер, Норин Мюррей, Рональд В. Дэвис и др.

КЛОНИРОВАНИЕ ДНК. МЕТОДЫ

Под ред. Дэвида М. Гловера

Заведующий редакцией чл.-корр. АН СССР

Т. М. Турпаев

Зам. зав. редакцией М. Д. Гроздова

Ст. научн. редактор М. Р. Погосбекова

Мл. редактор Н. Ю. Плавинская

Художник А. А. Захаров

Художественный редактор А. Я. Мусии

Технический редактор М. А. Страшнова

Корректор В. И. Киселева

ИБ № 6343

Сдано в набор 23.03.88. Подписано к печати 18.08.88.

Формат 60×90¹/₁₆. Бумага кн.-журнальная.

Печать высокая. Гарнитура литературная.

Объем 17,00 бум. л. Усл. печ. л. 34,00.

Усл. кр.-отт. 34,00. Уч.-изд. л. 41,04.

Изд. № 4/5319. Тираж 7200 экз. Зак. 196.

Цена 4 р. 40 к.

ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР»

В/О «Совэкспорткнига»

Государственного комитета СССР

по делам издательств, полиграфии

и книжной торговли.

129820, ГСП, Москва, И-110, 1-й Рижский пер., 2

Московская типография № 11 Союзполиграфпрома

при Государственном комитете СССР по делам

издательств, полиграфии и книжной торговли.

113105, Москва, Нагатинская ул., д. 1

1. Транскрипция и трансляция, под ред. Б. Хеймса, С. Хиггинса
2. Аффинная хроматография, под ред. П. Дина, У. Джонса, Ф. Милда
3. Культура животных клеток, под ред. Р. Фрешни
4. Иммунизированные клетки и ферменты, под ред. Дж. Вудворда
5. Вирусология, под ред. Б. Мейхи

В 1989 г. выпуск серии будет продолжен